

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**In vitro Untersuchungen beim Multiplen Myelom:  
NVP-BGT226, ein kombinierter Inhibitor von  
Phosphatidylinositol-3-Kinase und mammalian Target of  
Rapamycin, hemmt Wachstum, Proliferation und  
Zellzyklusprogression und induziert Apoptose**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Laura Schneider

aus  
Starnberg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Schmidmaier

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann  
Priv. Doz. Dr. Christoph Walz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Philipp Baumann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2013

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	Seite 1
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	5
2.1.	Zellkultur	
2.1.1.	Zelllinien	5
2.1.2.	Bestimmung der Zelldichte	5
2.1.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	5
2.1.4.	Primäre Myelomzellen	6
2.2.	Methoden	
2.2.1.	Messung der Zellvitalität: WST-1-Assay	7
2.2.2.	Apoptosemessung: Annexin/PI-Färbung	8
2.2.3.	SubG1/Zellzyklusanalyse: PI-Färbung	10
2.2.4.	Analyse der Zellproliferation: BrdU-Assay	12
2.2.5.	Western Blot	14
2.2.6.	Statistik	19
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1.	NVP-BGT226 hemmt den PI3K/Akt-Signalweg	20
3.2.	NVP-BGT226 hemmt Zellwachstum und induziert Apoptose	22
3.3.	NVP-BGT226 hemmt die Proliferation von Myelomzellen und IL-6-, IGF-1- und Stromazellmedium -induziertes Zellwachstum	29
3.4.	NVP-BGT226 bewirkt einen G1 Zellzyklusarrest	33
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	36
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	41
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	43
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	51
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	53

**9. Anhang**

54

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Philipp Baumann, Laura Schneider, Sonja Mandl-Weber, Fuat Oduncu and  
Ralf Schmidmaier.

**Simultaneous targeting of PI3K and mTOR with NVP-BGT226 is highly effective  
in multiple myeloma.**

*Anti-Cancer Drugs. 2012, 23:131-138.*

### 1. Einleitung

Das Multiple Myelom gehört zur Gruppe der aggressiven Non Hodgkin Lymphome und ist bis heute in den meisten Fällen unheilbar. Es handelt sich bei dieser Erkrankung um eine neoplastische Proliferation eines Plasmazellklons, für den die Akkumulation maligner Plasmazellen im Knochenmark und deren Sekretion eines monoklonalen Immunglobulins (Paraprotein) charakteristisch sind [1].

Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch Osteolysen mit Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen, Einschränkung der Knochenmarksfunktion (Verdrängung der intakten Hämatopoese), Infektanfälligkeit durch einen sekundären Antikörpermangel, Hyperkalzämie und Nierenfunktionsstörungen [2].

Die Inzidenz liegt derzeit bei 5/100000 jährlich, das Multiple Myelom ist damit der häufigste Tumor von Knochenmark und Knochen und für annähernd 10% aller hämatologischen Krebserkrankungen verantwortlich [3].

Den Ursprung der Erkrankung vermutet man in der Entartung von Vorläufer-B-Zellen in den Keimzentren lymphatischer Organe. Diese wandern anschließend ins Knochenmark, wo die Differenzierung zu Plasmazellen stattfindet. Da Plasmazellen selbst meist eine eher niedrige Proliferationsrate haben und selten im peripheren Blut vorkommen, stehen diese Vorläuferzellen in Verdacht, die Expansion und Dissemination der malignen Plasmazellen voranzutreiben und somit eine substanzielle Rolle in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms zu spielen [4]. Die entarteten Plasmazellen produzieren einen einheitlichen Typ von Immunglobulinen (IgG, IgA oder IgD) oder nur Leichtketten, die in großen Mengen zu Hyperviskosität des Blutes führen und toxisch auf Nierentubuli wirken. Dies und ihre Eigenschaft, Osteoklasten zu aktivieren und die Osteoblastenfunktion zu hemmen, führen zum typischen Krankheitsbild [5].

In den letzten Jahrzehnten gab es in der Behandlung des Multiplen Myeloms beträchtliche Fortschritte, so konnte etwa mit der Einführung der Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation das mediane Überleben der Patienten deutlich verlängert werden [6,7]. Zudem konnten mehrere Studien zeigen, dass bei ca. 10-15% der Patienten, welche mittels Tandem Hochdosischemotherapie behandelt worden waren und eine komplette Remission erzielten, eine Langzeitremission erreicht werden konnte [8,9]. Außerdem führte das wachsende Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung zur Entwicklung neuer

Medikamente, die weitere Erfolge in der Behandlung des Multiplen Myeloms erbrachten [10]. Darunter die Immunmodulatoren Thalidomid, Lenalidomid und zuletzt Pomalidomid, das zu Beginn des Jahres 2013 in den USA zur Behandlung von Patienten mit rezidiviertem und refraktärem Multiplem Myelom zugelassen wurde, und der Proteasominhibitor Bortezomib. Doch auch gegen diese hochpotenten Substanzen entwickelt der Myelomzellklon Resistenzen und folglich sterben die Patienten meist im Rezidiv an der Folge der Tumorprogression [11-14].

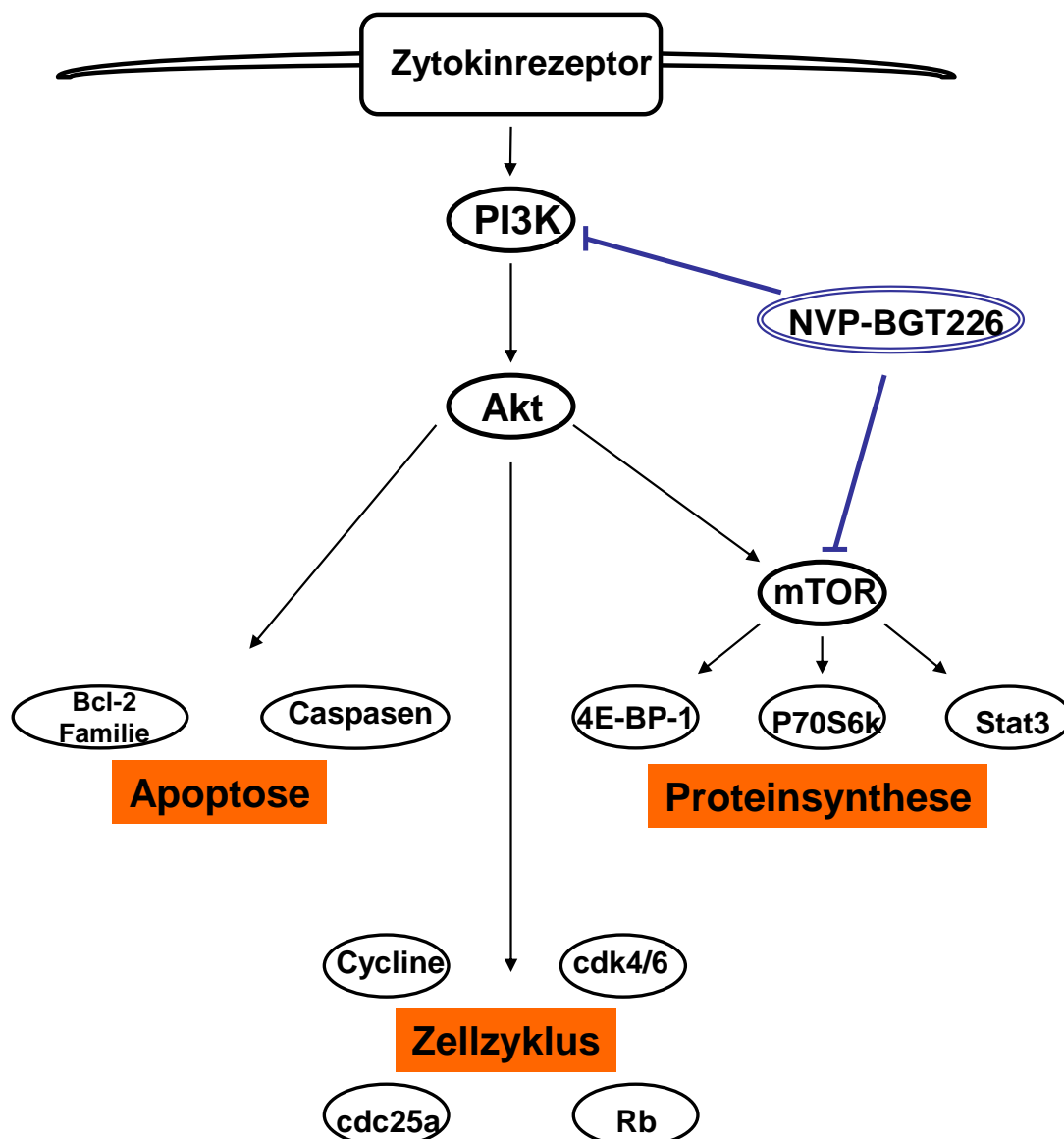
Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die dem Multiplen Myelom zugrunde liegen, hat sich in den vergangenen Jahren rapide verbessert. Es konnten unter anderem die Knochenmarkstromazellen als wichtige Interaktionspartner für Myelomzellen identifiziert werden [15,16]. So führen die Wechselwirkungen zwischen diesen Zellen zu erhöhter Adhesion und zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Signalmolekülen wie IGF-1, VEGF und IL-6 [16-18]. Intrazelluläre Signaltransduktionswege der Myelomzellen werden verstärkt, was Überleben und Proliferation der Myelomzellen sichert und Arzneimittelresistenzen zur Folge hat [19-23].

Auch das Verständnis verschiedener Signaltransduktionswege wie z.B. dem Jak/Stat- und dem PI3K/Akt/mTOR- Signalweg, und der Rolle von NFκB [24] hat zum Fortschritt beigetragen und führte zur Entwicklung spezifischer Signalweginhibitoren [25,26].

Mit der Substanz NVP-BGT226 liegt ein kombinierter Inhibitor von Phosphatidylinositol-3-Kinase und mammalian Target of Rapamycin vor, der sich bereits auf anderen Gebieten der Onkologie, vor allem bei Untersuchungen an soliden Tumoren bewährt hat [27-29]. Es schien vielversprechend, die Substanz an Myelomzelllinien zu testen, da der PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalweg auch eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms einnimmt [30].

PI3-Kinasen sind Enzyme, die in sämtlichen eukaryotischen Zellen vorkommen und entscheidenden Einfluss auf viele Signalwege haben, die Zellwachstum, Apoptose und Überleben der Zellen regulieren [31]. Man unterscheidet drei Klassen von PI3-Kinasen. Beim Multiplen Myelom spielen vor allem PI3-Kinasen der Klasse 1a, die aus der regulatorischen p85 und der katalytischen p110 Untergruppe bestehen, eine wichtige Rolle. Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert Akt, ebenfalls eine Proteinkinase, die wiederum eine große Anzahl zellulärer Signalmoleküle aktiviert, unter anderem auch via mTOR. Am Ende des Signalweges wird die Transkription

von Proteinen eingeleitet, die zentrale Rollen bei Zellwachstum, Proliferation, Zellzyklusprogression und Anti-Apoptose innehaben. Signalmoleküle, die in gesunden Zellen Kontrollfunktionen übernehmen, werden in malignen Zellen inhibiert. Die Fortführung des Zellzyklus wird so etwa durch die Hemmung der Zellzyklusinhibitoren p27, p21, cMyc und Cyclin D1 garantiert und über die Beeinflussung pro- und antiapoptotischer mitochondrialer Proteine, wie die der Bcl-2-Familie übt Akt weitere antiapoptotischen Effekte aus [32,33].



**Abbildung 1.: PI3K/Akt-Signalweg:** Der Signalweg über PI3K, Akt und mTOR steuert Apoptose, Zellzyklus und Proteinsynthese. Der kombinierte PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BGT226 hemmt zentrale Komponenten dieses Signalweges.

Es ist augenscheinlich sinnvoll, zentrale Komponenten, die am Beginn dieser Signaltransduktionswege stehen, zu hemmen. Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass eine alleinige Hemmung von mTOR zum kompensatorischen Anstieg anderer Signalmoleküle wie z.B. Akt führen kann [34,35]. So fand man etwa bei Myelomzellen, die mit Rapamycin, einem alleinigen mTOR-Inhibitor, behandelt wurden, signifikant erhöhte Aktivität von Akt und PI3K [34]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die alleinige Hemmung von mTOR auch der negative Feedbackmechanismus, der normalerweise zwischen mTOR und Akt besteht, inhibiert wird. Dies hat eine erhöhte Aktivität von Akt zur Folge und somit reduzieren reine mTOR-Inhibitoren paradoxerweise den von ihnen induzierten Antitumor-Effekt [35].

Ebenso verhält es sich bei alleinigen PI3K-Inhibitoren: Zwar zeigte sich bei einer ausschließlichen Hemmung der PI3K auch eine deutliche Reduktion der Proliferation und Akt-Aktivität in Myelomzellen, jedoch kam es bei kombinierter PI3K-mTOR-Hemmung wesentlich häufiger zum Zelltod. Zurückzuführen ist dies darauf, dass mTOR nicht ausschließlich über die PI3K sondern auch über andere, PI3K unabhängige Signalwege kontrolliert wird [36].

Diese Erkenntnisse und die daraus folgende Notwendigkeit dualer Inhibitoren führten in den letzten Jahren zur Entwicklung neuer Substanzen. So wird NVP-BEZ235, eine Substanz der ersten Generation von PI3K/mTOR-Inhibitoren bereits in ersten klinischen Studien untersucht.

In dieser Arbeit soll mit NVP-BGT226 eine Substanz der zweiten Generation von kombinierten PI3K/mTOR-Inhibitoren vorgestellt und ihr Einfluss auf Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose in Multiplen Myelomzellen untersucht werden.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Zellkultur:**

#### **2.1.1. Zelllinien**

Die humanen Myelomzelllinien NCI-H929, U266, OPM-2, RPMI-8226 stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ, Braunschweig). Sie wurden in RPMI-Medium bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem RPMI-Medium wurde zu 10% fetales Kälberserum (FCS) zugegeben, das zuvor eine halbe Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert wurde.

Bei einer Dichte von maximal  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurde die Kultur geteilt, eine Hälfte verworfen und die andere mit frischem Medium aufgefüllt. In der Zellkultur wurde kein Streptomycin/Penicillin verwendet.

Vor Verwendung der Zellen für ein Experiment wurde die Zellvitalität mithilfe einer Trypanblau-Färbung gesichert.

#### **2.1.2. Bestimmung der Zelldichte**

Um vor einem Ansatz die Zellzahl zu bestimmen wurden 30µl einer Zellsuspension mit 30µl Trypanblau gemischt und unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl pro ml bestimmt.

#### **2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zu Beginn wurde die Zellzahl der Kultur bestimmt, je  $10^7$  Zellen in ein steriles 50ml-Röhrchen gegeben und 6 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,9ml Medium (RPMI 1640 + 10% FCS) resuspendiert und in Kryoröhrchen abgefüllt. Es folgte die Zugabe von je 0,9ml Einfriermedium.

Einfriermedium: 3ml FCS

2ml DMSO

5ml Medium (RPMI 1640 + 10%FCS)

(Wurde zuvor hergestellt und bis Gebrauch auf Eis gestellt.)

Die Röhrchen wurden vorsichtig verschlossen und bei -80° C eingefroren.

Um Zellen wieder aufzutauen, wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen unter warmem Wasser geschwenkt und der Inhalt in ein mit 25ml frischem Medium gefülltes 50ml-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500rpm, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 25ml frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (75cm<sup>2</sup>) gegeben.

### **2.1.4. Primäre Myelomzellen**

Um mononukleäre Zellen aus Knochenmark zu gewinnen, wurde heparinisiertes Knochenmarkaspirat von Myelompatienten verwendet. Nach Aufklärung durch einen Arzt haben diese zuvor ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke gegeben. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

Die Aufreinigung der Myelomzellen erfolgte durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation, für welche Ficollhypaque verwendet wurde. Während der Zentrifugation trennen sich dabei Serum und Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte. In der Interphase zwischen Überstand (Plasma) und Ficollhypaque sammeln sich die mononukleären Zellen.

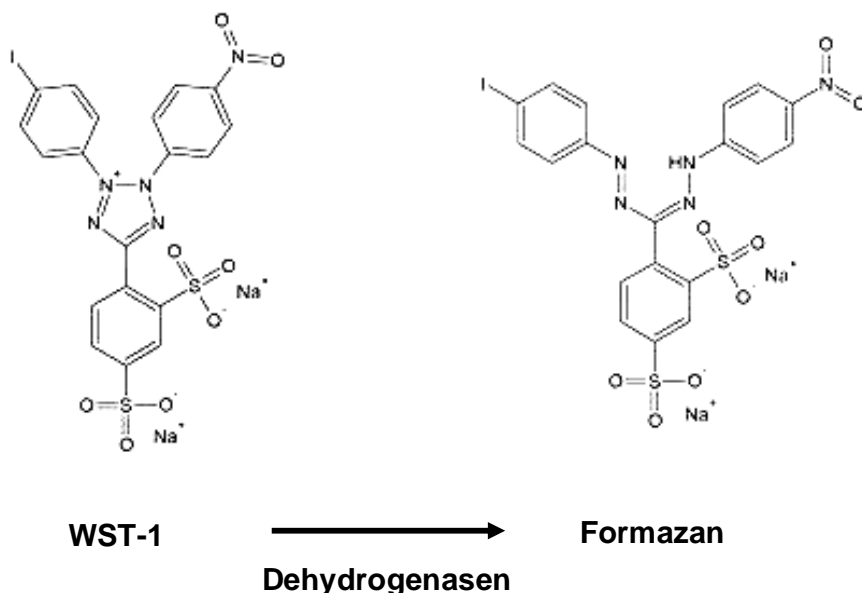
20ml des Ficollhypoques wurden in ein 50ml-Falcon-Röhrchen gegeben. 5ml des gewonnenen Patientenmaterials wurden zunächst mit PBS auf 20ml aufgefüllt, gevortext und anschließend langsam über das Ficollhypaque geschichtet.

Es folgte dann die Zentrifugation bei 1500 U/min für 30 Minuten bei 20°C. Anschließend wurde die Interphase („buffy coat“) abpipettiert und in Kulturmedium resuspendiert.

## 2.2. Methoden:

### 2.2.1. Messung der Zellvitalität: WST-1-Assay

Um die Zahl vitaler Zellen an verschiedenen Messzeitpunkten zu quantifizieren, wurde das Färbereagenz WST-1 verwendet. WST-1 ist ein wasserlösliches Tetrazoliums Salz, das von zellulären Enzymen wie mitochondrialen Dehydrogenasen umgesetzt wird. Nur metabolisch aktive Zellen mit intakten mitochondrialen Dehydrogenasen können WST-1 spalten. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag des schwach rot gefärbten WST-1 in das orange-rote Formazan, den man in einem Elisa Reader photometrisch messen kann. Da eine Reduktion der Zellviabilität auch mit der Reduktion mitochondrialer Dehydrogenasen einhergeht, ist die Menge des gebildeten Formazans und damit das Ausmaß der photometrisch bestimmten Extinktion proportional zur Anzahl der viablen Zellen.



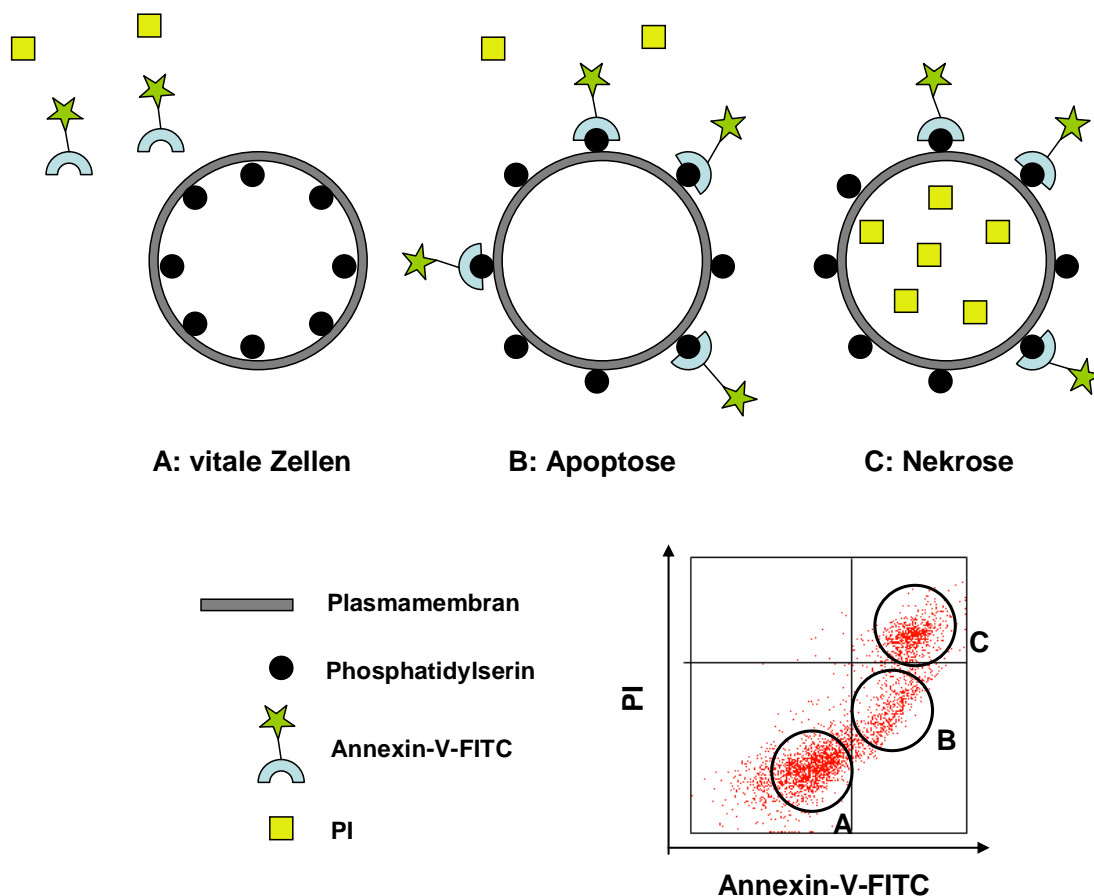
**Abbildung 2.1.:** WST-1 Assay: Umsetzung von WST-1 zu Formazan

48 und 96 Stunden vor Auswertung wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen/ml (bei primären Zellen  $2 \times 10^5$ /ml) mit Medium und verschiedenen Konzentrationen NVP-BGT226 angesetzt und auf 96well-Platten aufgetragen. Dabei wurden in jedes well 100µl (bei primären Zellen 200µl) pipettiert und die Platten anschließend im Brutschrank inkubiert.

Zwei Stunden vor Auswertung wurden pro well 10µl WST-1 (bei primären Zellen 20µl) dazugegeben und erneut im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Proben am Elisa Reader wurde bei 450nm vorgenommen (Referenzfilter 690nm).

## 2.2.2. Apoptosemessung: Annexin/PI-Färbung

Das Protein Annexin-V hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS), das sich bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite transloziert und Annexin-V kann daran binden. Diesen Vorgang kann man sich zunutze machen, um apoptotische Zellen zu kennzeichnen und so im Durchflusszytometer detektieren zu können. Um sie von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, kombiniert man die Annexin-V-Markierung mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung. PI dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen. In der frühen Phase der Apoptose sind Zellen daher Annexin-positiv und PI-negativ, später Annexin- und PI-positiv.



**Abbildung 2.2.: AnnexinV/PI-Assay:** Vitale Zellen sind Annexin- und PI-negativ (A), an frühapoptotische Zellen kann Annexin über Phosphatidylserin binden (B), spätapoptotische/nekrotische Zellen sind zusätzlich für PI permeabel (C).

48 Stunden vor Messung wurden pro Probe  $2,4 \times 10^5$  Zellen in 2ml RPMI Medium (10% FCS) angesetzt, NVP-BGT226 in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben und die Proben auf 24-well-plates aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank.

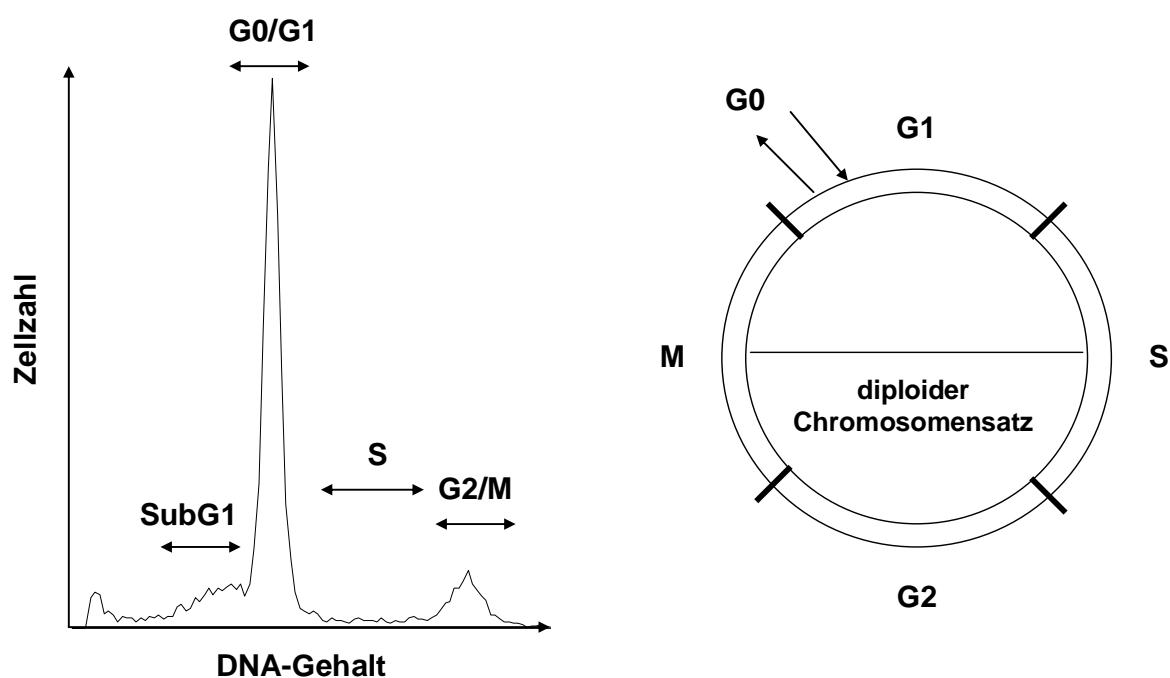
Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Ansätze in Facs-tubes überführt. Die Zellen wurden acht Minuten bei 4°C und 1700rpm abzentrifugiert und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100µl binding buffer resuspendiert. Anschließend wurden je 5µl Annexin zugegeben, die Proben mithilfe eines Vortex-Gerätes gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Während der Inkubation der Zellen wurde eine 1:20-PI Lösung durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Es folgte die Zugabe von je 10µl der PI-Lösung und 400µl binding buffer. Unmittelbar vor der Messung wurde jede Probe gründlich gevortext.

### 2.2.3. SubG1/Zellzyklusanalyse: PI-Färbung

Untersuchungen des Zellzyklus am Durchflusszytometer sind möglich, da der DNA-Gehalt der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich ist. In der G<sub>0</sub>-Phase befindet sich die Zelle in einem Ruhezustand, in der G<sub>1</sub>-Phase findet RNA-, Proteinsynthese und Zellwachstum statt, in der S-Phase kommt es dann zu DNA-Replikation und Chromosomenverdopplung. Die G<sub>2</sub>-Phase dient der Vorbereitung der Mitose, die sich an diese anschließt und die Zellteilung beinhaltet.

So ist der DNA-Gehalt zwischen S-Phase und Mitose doppelt so groß wie in einer postmitotischen oder ruhenden Zelle. Einen noch geringeren DNA-Gehalt besitzen apoptotische Zellen, da während der Apoptose die DNA enzymatisch verdaut und zum Teil aus der Zelle ausgeschleust wird. Diese Zellen finden sich bei der Auswertung am Durchflusszytometer in der sogenannten SubG<sub>1</sub>-Population.

Die nukleäre DNA kann mittels des fluoreszierenden Farbstoffs Propidiumiodid (PI) angefärbt und dieser durch einen Laser angeregt werden. Da die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, kann man so den Zellzyklusstatus einer Zelle bestimmen.



**Abbildung 2.3.: Zellzyklusanalyse durch PI-Färbung: DNA-Histogramm und Zellzyklusschema:** Aus der Messung einer Vielzahl von Zellen entsteht das DNA-Histogramm (links). Das Schema des Zellzyklus (rechts) zeigt die verschiedenen Phasen, wobei in der S- und der M-Phase teilweise, in der G<sub>2</sub>-Phase vollständig ein diploider Chromosomensatz vorliegt.

48 Stunden vor Messung wurden pro Probe  $2,4 \times 10^5$  Zellen in 2ml RPMI Medium (10% FCS) angesetzt, die Substanz NVP-BGT226 in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben und die Proben auf 24-well-plates aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank.

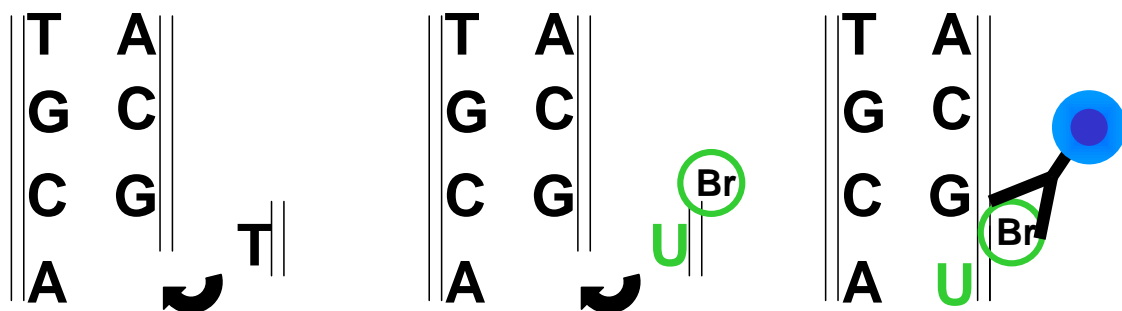
Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Ansätze in Facs-tubes überführt. Die Zellen wurden sechs Minuten bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml EtOH70% resuspendiert. Es folgte eine Inkubation über eine Stunde bei -20°C.

Nach sechsminütiger Zentrifugation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension der Zellen in 1ml PBS wurden je 25µl RNase und 40µl Propidiumiodid zugefügt. Nach erfolgtem vortexen wurden die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Proben in neue Facs-tubes filtriert und auf Eis gestellt.

### 2.2.4. Analyse der Zellproliferation: BrdU-Assay

Die Analyse der Zellproliferation erfolgte mittels BrdU-Assay. Gibt man das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin (BrdU) zu proliferierenden Zellen, wird es aufgenommen und anstatt von Thymidin in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut.

Nach Bindung eines ersten monoklonalen BrdU-Antikörpers und eines weiteren Detektor-Antikörpers, der an den ersten Antikörper bindet, wird ein horseradish-Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper zugegeben. Diese Peroxidase katalysiert die Umwandlung des fluoresgenen Substrats in ein blau fluoreszierendes Produkt, dessen Intensität proportional zur Menge des eingebauten BrdU ist.



**Abbildung 2.4.: Analyse der Proliferation durch BrdU-Assay:** In Anwesenheit von BrdU wird dieses anstatt von Thymidin in neusynthetisierte DNA-Stränge eingebaut. Die im Elisa Reader detektierte Fluoreszenz ist proportional zur Menge des eingebauten BrdU.

Angesetzt wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen/ml, mit verschiedenen Konzentration von NVP-BGT226 versetzt und auf 96well plates übertragen. Dabei wurden pro well 100µl aufgetragen.

Nach 48stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen weiterverarbeitet. Dazu wurde ein Proliferation-KIT der Firma Roche verwendet.

Nach Zentrifugation der 96well-Platten bei 1800rpm und RT über 10 Minuten wurden die Überstände entfernt, die Zellen für eine Stunde bei 60°C getrocknet und anschließend mit 200µl FixDenat pro well fixiert. Es folgte eine Inkubation über 30 Minuten bei RT bevor das FixDenat wieder vollständig aus den Platten entfernt wurde. Dann wurden in jedes well 100µl Anti-BrdU-POD Arbeitslösung (Anti-BrdU-POD-Lösung im Verhältnis 1:100 mit Inkubationspuffer verdünnt) gegeben.



Nach einer Inkubation von 90 Minuten bei RT wurde die Lösung entfernt, die wells dreimal mit je 200µl Waschpuffer gewaschen und 100µl Substrat pro well zugegeben. Die Platten wurden erneut bei RT inkubiert und nach 5 bis 30 Minuten konnte eine Farbentwicklung beobachtet werden. Direkt vor der Messung am Elisa Reader wurde die Reaktion durch Zugabe von 25µl einer 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung pro well gestoppt. Gemessen wurde am Elisa Reader bei 450nm und einem Referenzfilter von 690nm.

### **2.2.5. Western Blot**

Um die Expression von Proteinen darzustellen, kann man das Verfahren des Western Blots verwenden. Dabei werden Zellen lysiert, die intrazellulären Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Mittels monoklonaler Antikörper können die gesuchten Proteine nachgewiesen werden.

#### **Zellyse**

Pro Ansatz wurden  $50 \times 10^5$  Zellen mit verschiedenen Konzentrationen bzw. über verschiedene Zeiträume im Brutschrank inkubiert und anschließend lysiert. Dazu wurden die Zellen bei 1700 U/min für 8 Minuten bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 4ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder dekantiert, die Zellpellets in 1ml PBS resuspendiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 2500 U/min für 6 Minuten bei 6°C, so dass der zellfreie Überstand anschließend vollständig abpipettiert und verworfen werden konnte.

Je nach Größe des Pellets wurde 100-150µl Lysepuffer (siehe unten) zugegeben und die Zellsuspension gut gevortext. Das Lysieren der Zellen und somit das Freisetzen der intrazellulären Proteine erfolgte über 30 Minuten lang auf Eis. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10-15µl 10% NP-40 (IGEPAL CA-630), das Verhältnis von Lysepuffer zu NP-40 betrug dabei immer 10:1. Nach 15-minütiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C wurden die Proben bei 13.000 U/min für 15 Minuten bei 6°C zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände mit den gesuchten intrazellulären Proteinen in neue Eppendorf-Gefäße transferiert und die Pellets mit den unbrauchbaren Zellresten verworfen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des photometrischen Bradford-Assays. Dazu wurden je 2µl einer Probe mit 800µl Aqua dest. und 200µl eines Färbereagens (BioRad Protein Assay solution®) versetzt. Nach 5 Minuten wurde dann die Proteinkonzentration bei 595nm mit Hilfe des Eppendorf BioPhotometers bestimmt.

#### **Gel-Elektrophorese**

Um die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben einander mengenmäßig anzupassen, wurden sie mit Lysepuffer verdünnt. Um ein Beladen der Geltaschen zu

ermöglichen, wurden anschließend jeweils 50µl einer Probe im Verhältnis 1:1 mit Loading Buffer versetzt. In den sicher verschlossenen Proben wurden die Proteine für 5 Minuten durch Kochen denaturiert und dann bei 6000 U/min für 2 Minuten bei 6°C zentrifugiert. Es folgte das Beladen der vorbereiteten Polyacrylamidgele mit den Proben.

Trenngel (Mengenangaben für 4 Gele):

Substanz	10%	12%	15%
Aqua dest.	10,4 ml	8,8 ml	5,9 ml
Tris, 1,5M, pH 8,8	6,3 ml	6,3 ml	6,3 ml
Acrylamid/Bis, 30%	8,3 ml	9,8 ml	12,3 ml
APS 10%	250 µl	250 µl	250 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

Die Trenngele wurden nach den obigen Angaben gegossen, wobei die Gelplatten zu  $\frac{3}{4}$  mit der jeweiligen Gellösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet wurden, so dass ein glatter Abschluss entstand. Nach erfolgter Polymerisation konnte nach ca. 30 Minuten das Sammelgel gegossen werden.

Sammelgel (Mengenangaben für 4 Gele):

Substanz	
Aqua dest.	9 ml
Tris, 1M, pH6,8	3,8 ml
Acrylamid/Bis 30%	1,9 ml
APS 10%	250 µl
TEMED	25 µl

Das Isopropanol wurde zunächst entfernt, anschließend das Sammelgel gegossen und die Kämme als Platzhalter für die Taschen eingefügt.

Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurden diese in die mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresebehälter gestellt, die Kämme entfernt und die Taschen gespült. Anschließend wurde jede Tasche mit jeweils 10µl der

Proteinlösung bzw. 7µl des Markers (Kaleidoscope-precision plus protein standard-Biorad) beladen. Die Elektrophorese wurde mit dem Power Supply „Power Pac 300“ (BioRad) durchgeführt. Begonnen wurde zunächst bei 80V, wenn die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die angelegte Spannung auf 100V erhöht. Nach etwa zwei Stunden wurde der Lauf gestoppt.

### **Transferblot**

Im Transferblot werden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine von den Gelen auf die PVDF- Membranen transferiert. Dazu wurden die Membranen zurechtgeschnitten, für 15 Sekunden in 100% Methanol, 2 Minuten in Wasser und zusammen mit den Schwämmen und Filterpapieren für 2 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Die von Sammelgel befreiten Gele wurden dann luftblasenfrei auf die vorbereiteten Membranen aufgebracht, zwischen Filterpapiere und Schwämme gelegt und in die mit Transferpuffer gefüllten Transferbehälter gesetzt. Der anschließende Transfer erfolgt bei 23V über Nacht im Kühlraum (6°C).

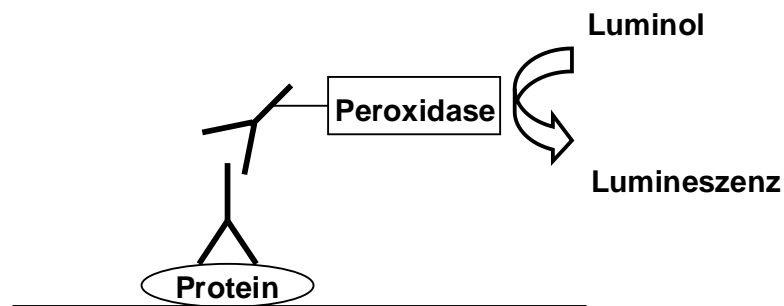
### **Proteinnachweis**

Der Proteinnachweis basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das Protein auf der Membran bindet. Ein Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist und so mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann, bindet wiederum an den Primärantikörper.

Dazu wurden die Membranen nach dem Transfer luftgetrocknet und anschließend mit jeweils 15ml einer Magermilchpulverlösung (M-TBS-T) für 1 Stunde bei 40 Mot1/min auf einem Schüttler inkubiert, um im Folgenden eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach wurden die Membranen bei 70 Mot1/min viermal für jeweils 8 Minuten gewaschen. Anschließend wurden primäre Antikörper, die im Verhältnis 1:1000 mit TBST-Puffer verdünnt wurden, auf die Membranen gegeben (jeweils 10ml der Antikörper-Lösung). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 40 Mot1/min im Kühlraum (6°C).

Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen, um so die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die sekundären Antikörper, die im Verhältnis 1:2000 mit M-TBS-T-Puffer verdünnt wurden, hinzugegeben (jeweils 10ml der Antikörper-Lösung).

Nach erfolgter Inkubation bei 40 Mot1/min über eine Stunde, während der die sekundären Antikörper an die primären Antikörper binden konnten, wurden die Membranen wieder viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen und je 3 ml der ECL-Lösung zu den Membranen hinzupipettiert. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wurde von der an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase umgesetzt, wobei nach unterschiedlichen Expositionszeiten eine Lumineszenz detektiert und auf Röntgenfilm festgehalten werden konnte.



**Abbildung 2.5.: Proteinnachweis durch Chemolumineszenz:** An das auf der Membran haftende Protein binden ein primärer und ein sekundärer Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese setzt Luminol um, wodurch eine Lumineszenz detektiert werden kann.

### Membran-Stripping

Um die Membranen für den Nachweis anderer Proteine wiederverwenden zu können, mussten sie zunächst von Antikörpern befreit werden.

Dazu wurden die Membranen in einer Mischung aus 100ml Stripping-Lösung und 960µl Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad geschwenkt und anschließend viermal bei 70 Mot1/min für jeweils 8 Minuten gewaschen. Dann konnte erneut mit den Arbeitsschritten des Proteinnachweises begonnen werden.

## **Pufferlösungen**

Lysepuffer (für 10ml)	Aqua dest. 8.18ml, Tris (1M, pH 7.6) 250µl, NaF (1M) 100µl, EDTA (0.5M) 200µl, Aprotinin (2.1mg/ml) 50µl, Leupeptin (5mg/ml) 20µl, PMSF (100mM) 100µl, Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (100mM) 100µl
Elektrophoresepuffer (10x, pH 8.3)	Tris 151.4g, Glycin 720.65g, Natriumdodecylsulfat 50g, auf 5 l gereinigtes Wasser, pH 8.3 mit HCl einzustellen
Transfer-Puffer	Tris 30.28g, Glycin 144.13g, Methanol 1580ml, auf 10l gereinigtes Wasser
TBS (10x, pH 7.6)	Tris 121g, Natriumchlorid 400g, auf 5l gereinigtes Wasser, pH 7.6 mit HCl einzustellen
TBS-T-Puffer	100ml TBS, 900ml Aqua dest., 500µl Tween20
M-TBS-T	10g Magermilchpulver, 200ml TBS-T-Puffer
Solution A	200ml 0.1M TRIS-HCl (pH 8.6), 0.05g Luminol Sodium Salt
Solution B	0.011g para-Hydroxycoumarinsäure gelöst in 10ml DMSO
ECL-Lösung	10ml Solution A, 3µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 1 ml Solution B
Stripping-Lösung	7.56g Tris, 20g SDS, pH 6.7, vor der Anwendung: Zugabe von β-Mercaptoethanol

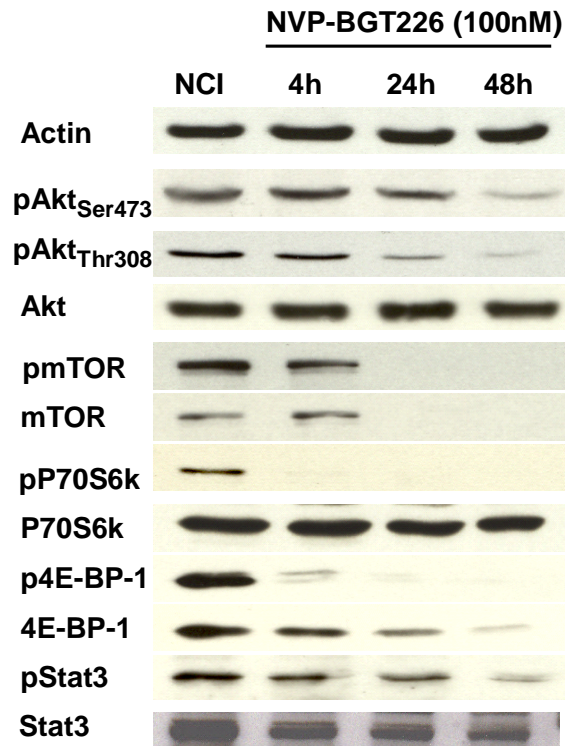
### **2.2.6. Statistik**

Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von repräsentativen Experimenten. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet. Zum Vergleich verschiedener Gruppen wurde der Wilcoxon Test (SPSS 15.0 für Windows®) verwendet, wobei p-Werte  $< 0.05$  als statistisch signifikant angesehen wurden (in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet).

### 3. Ergebnisse

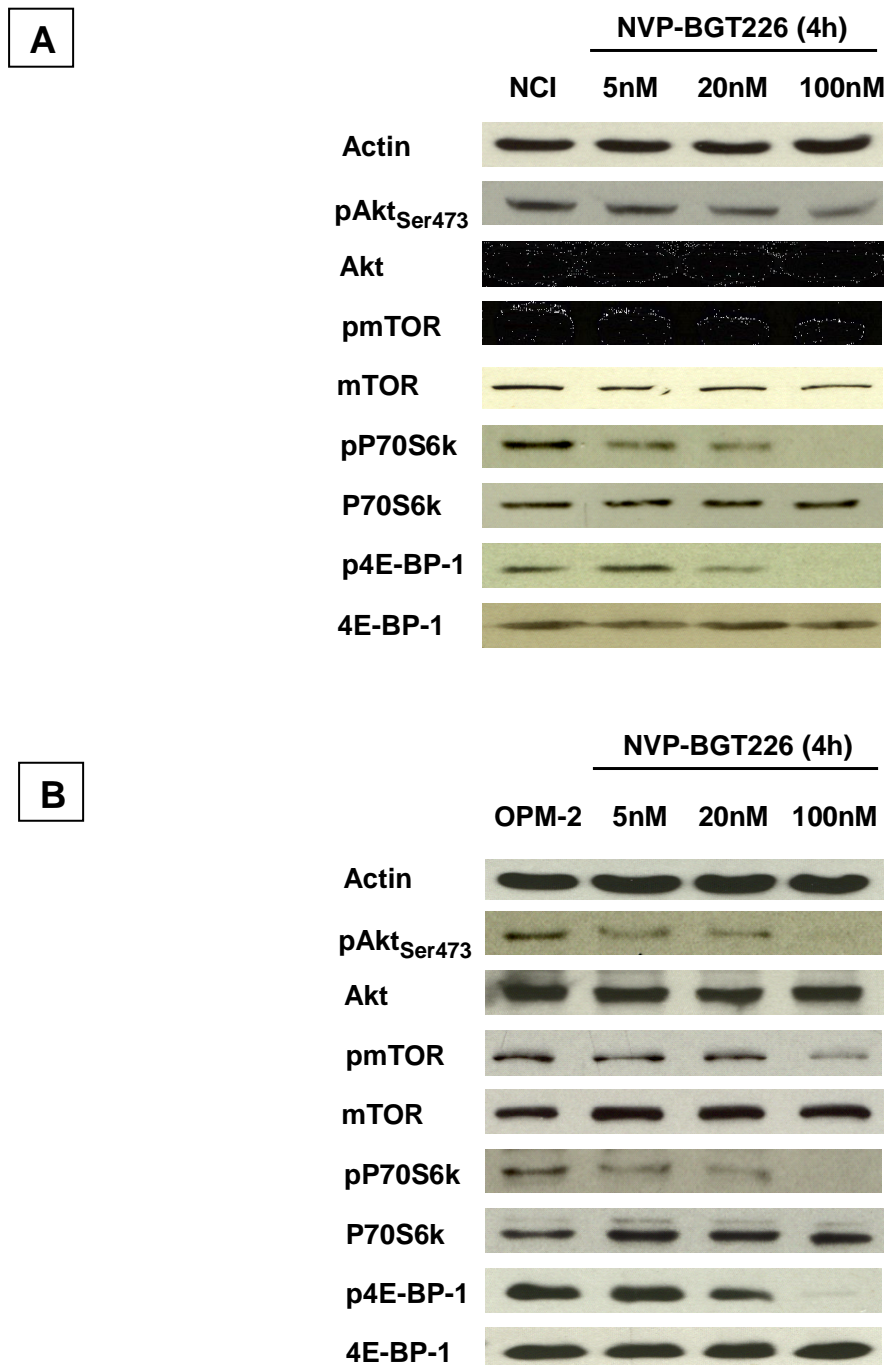
#### 3.1. NVP-BGT226 hemmt den PI3K/Akt-Signalweg

Wachstum und Proliferation von Myelomzellen sind stark abhängig von der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges. Da NVP-BGT226 als PI3K/Akt-Inhibitor gilt, sollten Western Blot Experimente den inhibitorischen Effekt dieser Substanz auf den PI3K Signalweg genauer charakterisieren. Dafür wurden NCI-H929-Zellen für 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Das Ergebnis der Western Blots zeigte eine signifikante Reduktion von phosphoryliertem Akt, mTOR, P70S6k und 4E-BP-1 (Abb. 3.1.). Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde der gleiche Versuch mit Zellen der Linien OPM-2 und NCI-H929 und verschiedenen Konzentrationen von NVP-BGT226 durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für einen Zeitraum von 4h mit Konzentrationen von 5, 20 und 100nM inkubiert. Die Auswertung dieser Western Blots zeigte ebenfalls eine starke Dephosphorylierung von Akt, mTOR, P70S6k und 4E-BP-1, wobei das absolute Proteinlevel von Akt und P70S6k unverändert blieb (Abb.3.2. A,B).



**Abbildung 3.1.: Western Blot: Inkubation von Myelomzellen der Linie NCI-H929 (NCI) mit NVP-BGT226 führt zur starken Dephosphorylierung von Akt, mTOR, P70S6k, 4E-BP-1 und Stat3.** Die Zellen wurden über 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen.



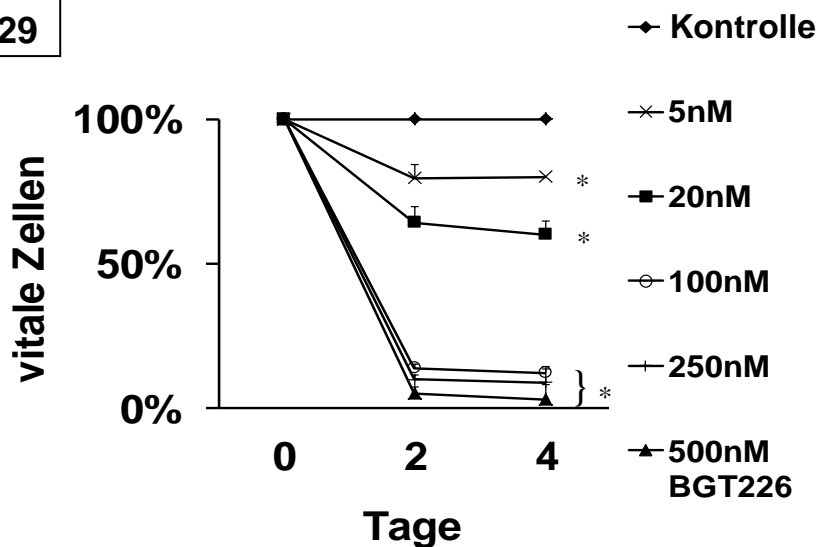


**Abbildung 3.2.: Western Blot: Inkubation von Myelomzellen der Linien NCI-H929 (NCI) und OPM-2 mit NVP-BGT226 führt zur starken Dephosphorylierung von Akt, mTOR, P70S6k und 4E-BP-1. Die Zellen wurden über 4h mit 5, 20 und 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen.**

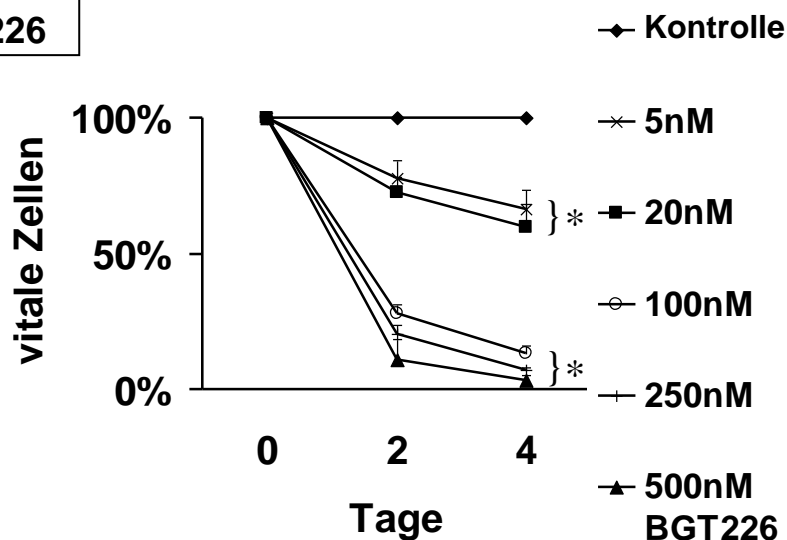
### 3.2. NVP- BGT226 hemmt Zellwachstum und induziert Apoptose

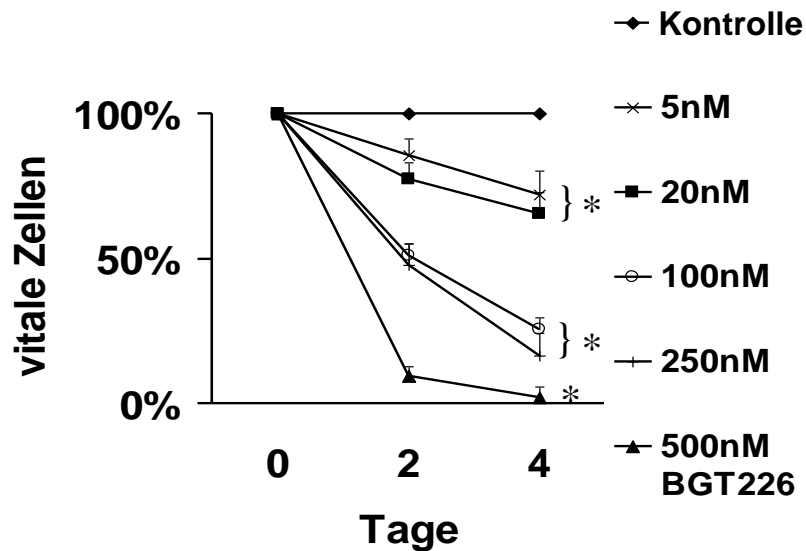
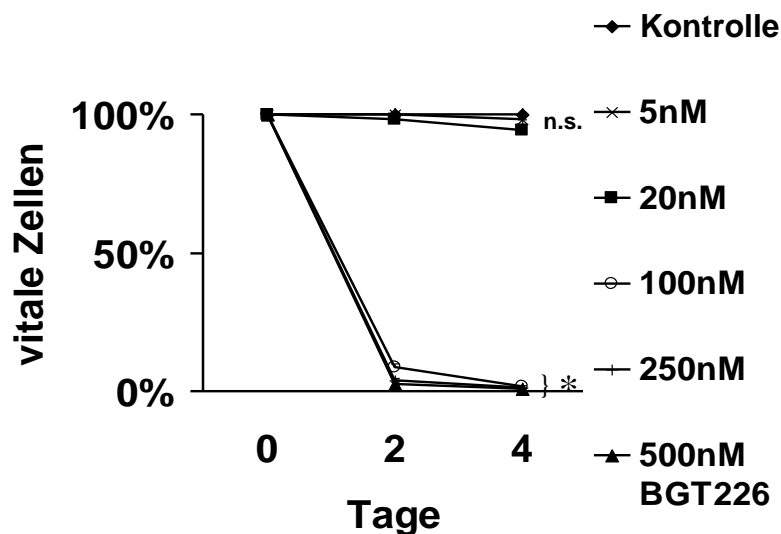
Um den zytotoxischen Effekt zu untersuchen, den NVP-BGT226 auf die verschiedenen Myelomzelllinien hat, wurde die Zellviabilität durch einen WST-1 Assay bestimmt. Zellen der Linien NCI-H929, RPMI-8226, U-266 und OPM-2 wurden mit steigenden Konzentrationen von NVP-BGT226 inkubiert und der Anteil stoffwechselaktiver, vitaler Zellen nach 48 und 96h gemessen. Wie Abb. 3.3. (A-D) zeigt, wurde das Wachstum der Myelomzellen zeit- und dosisabhängig gehemmt. Bereits Konzentrationen im Bereich von 20-100nM zeigten in allen vier Zelllinien einen deutlichen zytotoxischen Effekt.

**A: NCI-H929**



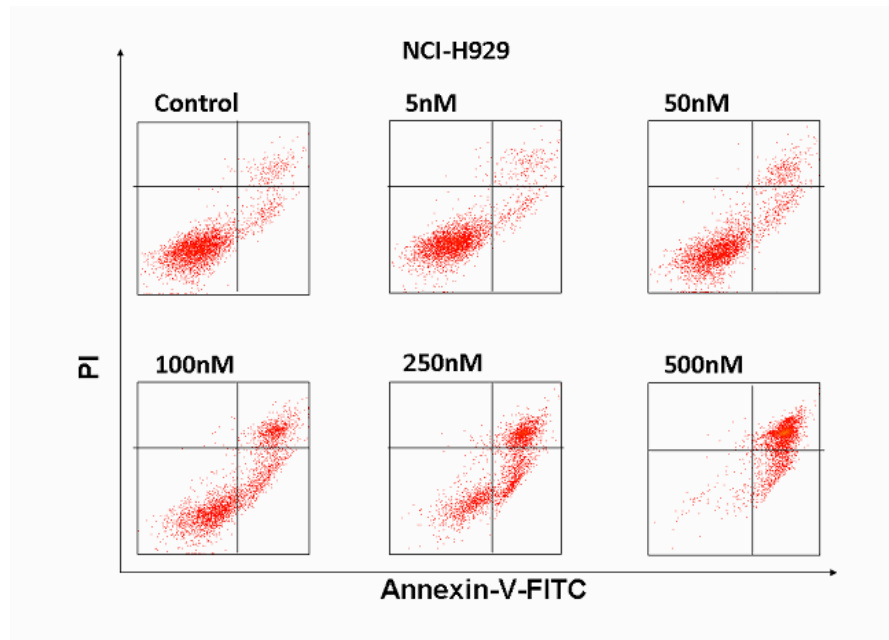
**B: RPMI-8226**



**C: U266****D: OPM-2**

**Abbildung 3.3.: NVP-BGT226 hemmt das Zellwachstum:** Die Zellen der Linien NCI-H929 (NCI), RPMI-8226 (RPMI), U266 und OPM-2 (OPM) wurden über 24 und 48h mit Konzentrationen von 5-500nM NVP-BGT226 inkubiert und das Zellwachstum mit WST-1 Assays bestimmt.

Desweiteren sollten die Versuche zeigen, ob die von NVP-BGT226 induzierte Hemmung des Zellwachstums auf Induktion von Apoptose oder Hemmung der Proliferation zurückzuführen ist. Dies wurde anhand eines Annexin-PI-Assays untersucht, wobei Zellen der verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von NVP-BGT226 über 48h inkubiert und anschließend per Durchflusszytometrie analysiert wurden (Abb.3.4.).

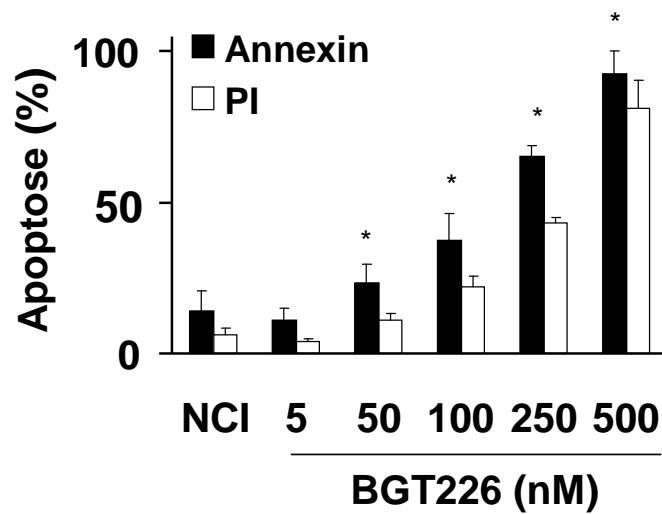


**Abbildung 3.4.: Induktion von Apoptose, Darstellung der Annexin-V/PI-Färbung:** Zellen der NCI-H929-Linie wurden über 48h mit Konzentrationen von 5-500nM NVP-BGT226 inkubiert. Die Abbildung zeigt eine deutliche Verlagerung der Zellen vom Annexin-V-FITC und PI negativen Bereich bei der Kontrolle über den frühapoptotischen Bereich (Annexin-V positiv, PI negativ) in den spätapoptotischen Bereich (zweifach positiv) bei 500nM.

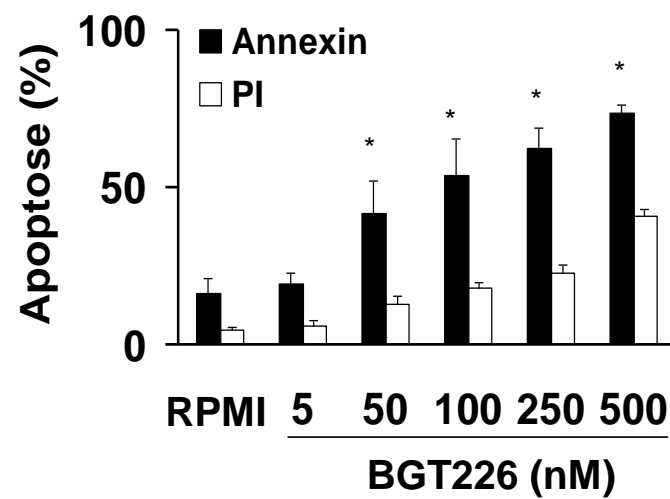
In Abb.3.5. (A-D) sieht man, dass es bei 3 von 4 Zelllinien zu starker Induktion von Apoptose kommt. OPM-2-, NCI-H929- und RPMI-8226-Zellen zeigten eine deutliche Annexin-V-Positivität nach Inkubation mit NVP-BGT226, die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) lag zwischen 100 und 250nM. Interessanterweise ließen sich U266-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien weniger gut anfärben, obwohl der vorangegangene WST-Assay eine sehr starke Hemmung des Wachstums gezeigt hatte.

Zusätzlich wurde dieser Versuch auch an primären Zellen von insgesamt sieben verschiedenen Patienten durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit Konzentrationen von 5-500nM NVP-BGT226 für 48h inkubiert. Es zeigte sich, dass selbst bei diesen normalerweise weniger sensitiven und langsamer proliferierenden primären Myelomzellen eine deutliche Hemmung des Zellwachstums durch NVP-BGT226 erreicht werden konnte, vergleichbar mit den Ergebnissen der kultivierten Zelllinien (Abb.3.6.).

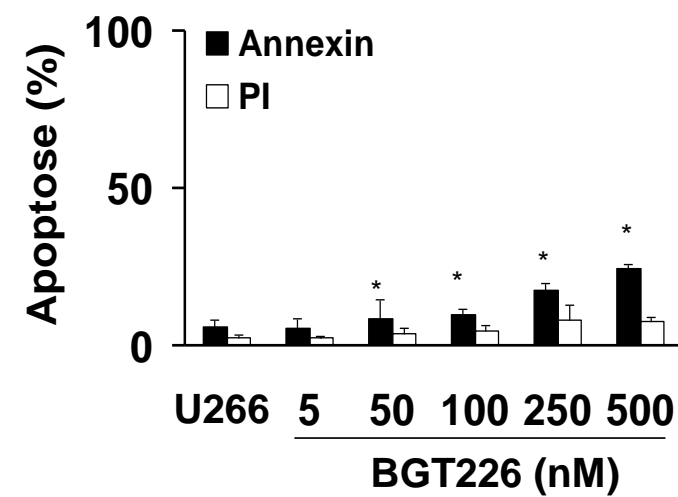
**A**



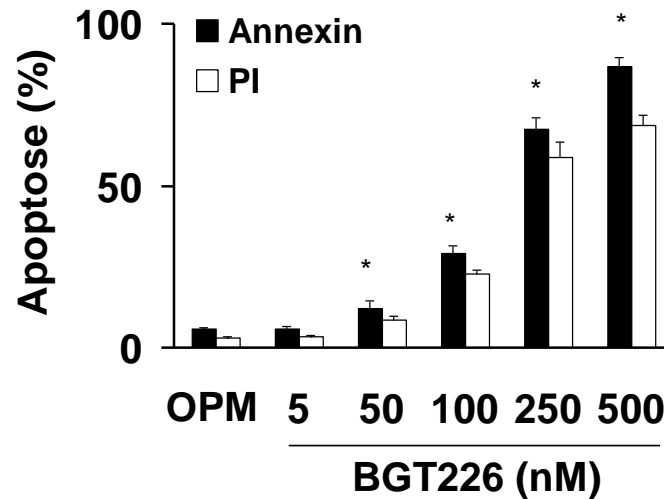
**B**



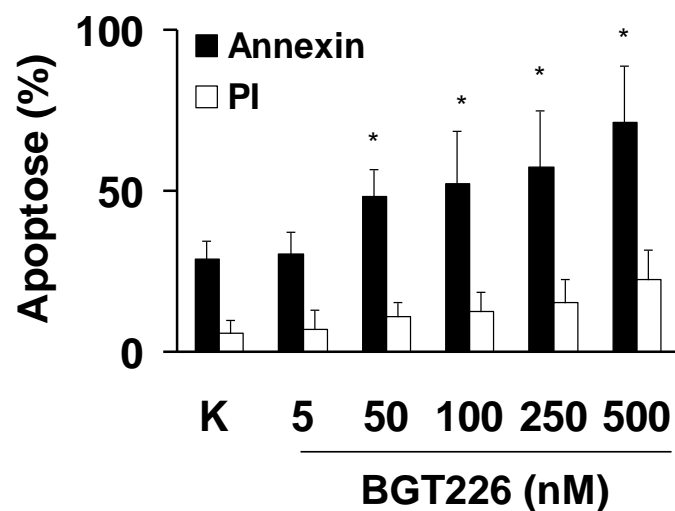
**C**



D

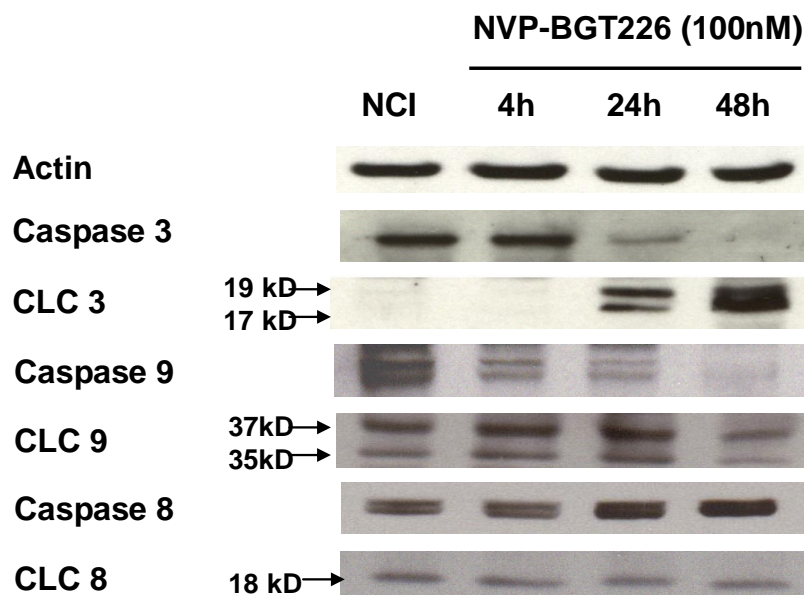


**Abbildung 3.5.: NVP-BGT226 induziert Apoptose bei Myelom-Zelllinien:** Die Zellen der Linien NCI-H929 (NCI), RPMI-8226 (RPMI), U266 und OPM-2 (OPM) wurden über 48h mit Konzentrationen von 5-500nM NVP-BGT226 inkubiert. Das Ausmaß der Apoptose wurde nach einer Annexin/PI-Färbung im Durchflusszytometer gemessen.

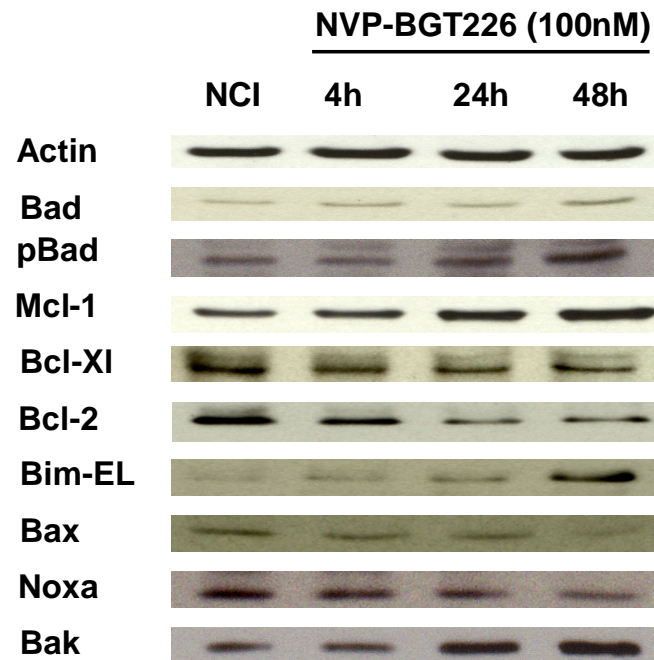


**Abbildung 3.6.: NVP-BGT226 induziert Apoptose bei primären Myelomzellen:** Primäre Myelomzellen von insgesamt 7 Patienten wurden jeweils über 48h mit Konzentrationen von 5-500nM NVP-BGT226 inkubiert und das Ausmaß der Apoptose nach Annexin/PI-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt (K=Kontrolle).

Durch Western Blots sollte die Apoptoseinduktion genauer untersucht werden. Dafür wurden Zellen der Linie NCI-H929 mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert und zwar über einen Zeitraum von 4, 24 und 48 Stunden. Bei der Untersuchung der Expression von Caspase 3 und Cleaved Caspase 3 zeigte sich eine starke Spaltung von Caspase 3. Die zusätzliche Analyse von Caspase 8, Cleaved Caspase 8, Caspase 9 und Cleaved Caspase 9 ergab eine verminderte Expression von Caspase 9 und eine leicht verstärkte Expression von Cleaved Caspase 9 nach Inkubation mit NVP-BGT226 (Abb. 3.7.). Dies spricht dafür, dass die Apoptose über den intrinsischen Signalweg eingeleitet wurde. Um die Mechanismen der Apoptoseinduktion genauer zu untersuchen, wurde dieser Versuch auch mit pro- und antiapoptotischen mitochondrialen Proteinen der Bcl-2-Familie durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression von proapoptotischen Proteinen wie Bim, Bak und moderat auch von Mcl-1, Bad und pBad sowie eine Verminderung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bax, Noxa und Bcl-XI (Abb. 3.8.).



**Abbildung 3.7.: Western Blot: Inkubation von Myelomzellen der Linie NCI-H929 (NCI) mit NVP-BGT226 führt zur Spaltung von Caspase 3 und Caspase 9.** Die Zellen wurden über 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen.



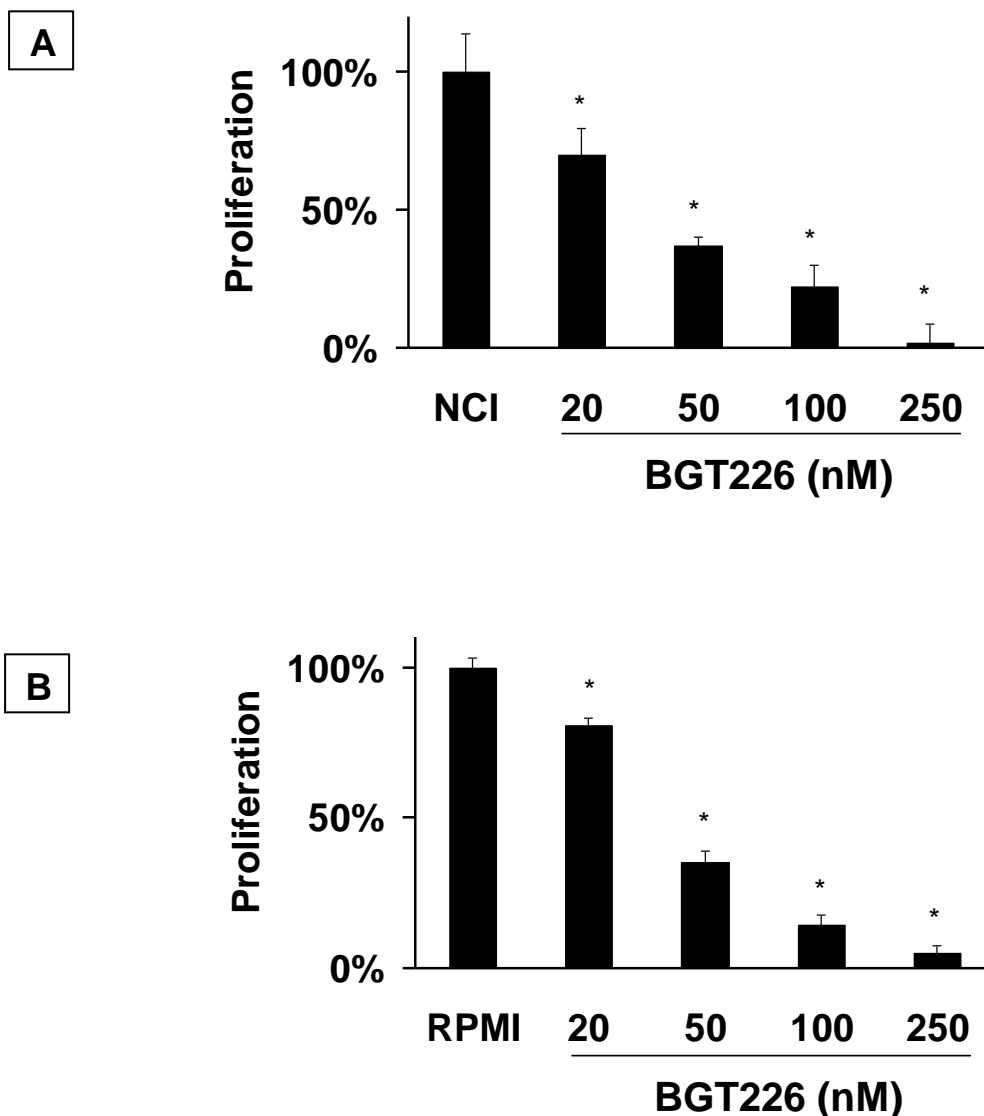
**Abbildung 3.8.: Western Blot: Inkubation von Myelomzellen der Linie NCI-H929 (NCI) mit NVP-BGT226 führt zur gesteigerten Expression proapoptotischer Proteine wie Bad, pBad, Mcl-1, Bim-EL und Bak und zur verminderten Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-XI, Bcl-2, Bax und Noxa.** Die Zellen wurden über 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen.

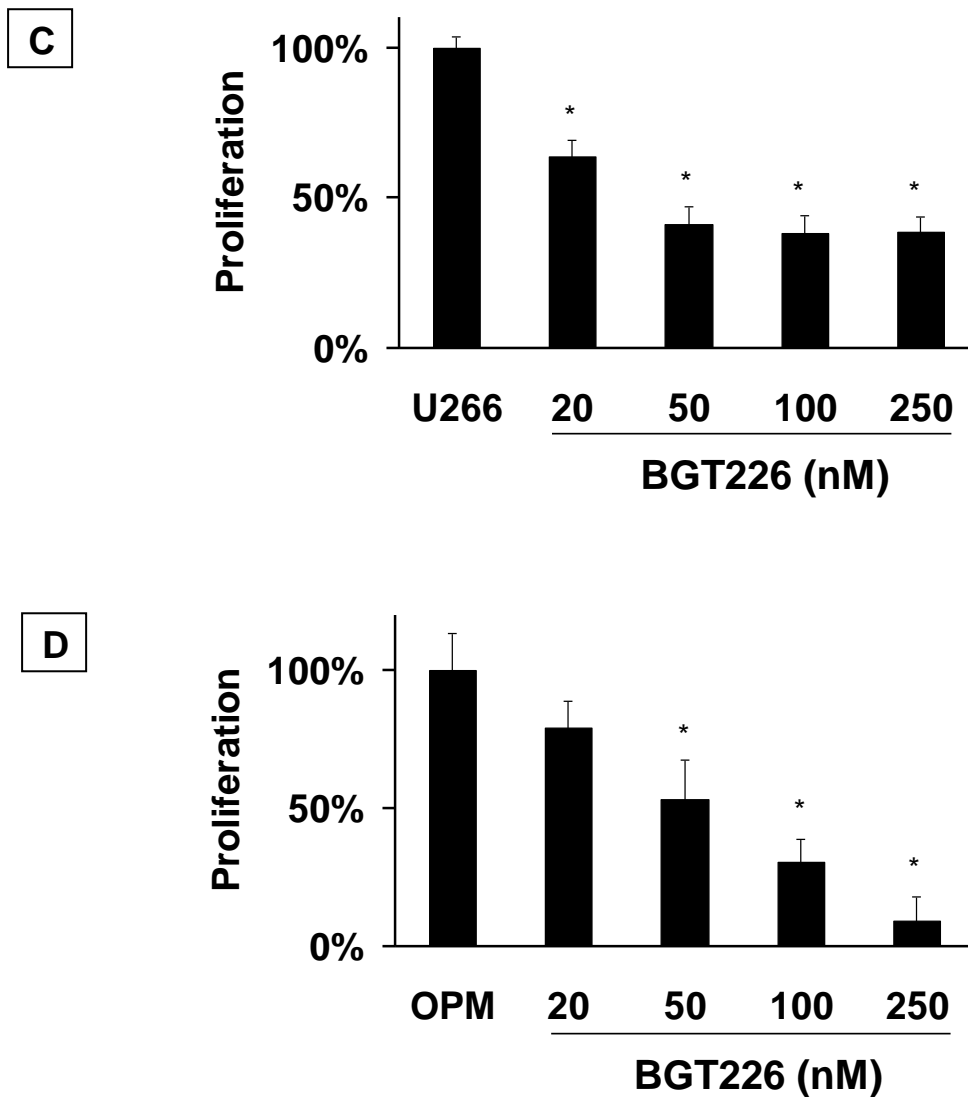
Diese Ergebnisse zeigen, dass NVP-BGT226 das Wachstum von Myelomzellen inhibiert und bereits in nanomolaren Konzentrationen Apoptose induziert. Diese apoptotischen Zellen weisen vermehrt proapoptotische und verminderte antiapoptotische mitochondriale Proteine auf.



### 3.3. NVP-BGT226 hemmt die Proliferation von Myelomzellen und IL-6-, IGF-1- und Stromazellmedium -induziertes Zellwachstum

Da NVP-BGT226 das Wachstum von Myelomzellen hemmt, stellte sich die Frage, ob und über welche Mechanismen die Substanz dabei auch Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Dies wurde mit einem BrdU-Assay geprüft. Vier Zelllinien wurden über 48h mit steigenden Konzentrationen von NVP-BGT226 inkubiert. 12h vor dem Ernten der Zellen wurde BrdU hinzugegeben. Abb.3.9. (A-D) zeigt, dass die Proliferation aller vier Zelllinien stark vermindert war. Nur Zellen der Zelllinie U266 waren bei einer Konzentration von 250nM noch nicht komplett gehemmt, was jedoch bei einer Konzentration von 500nM vollständig erreicht werden konnte.



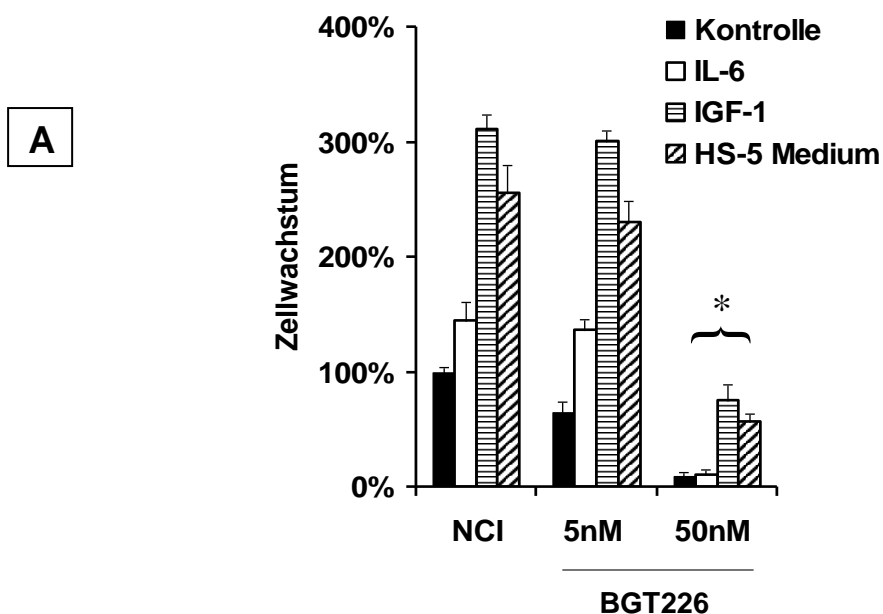


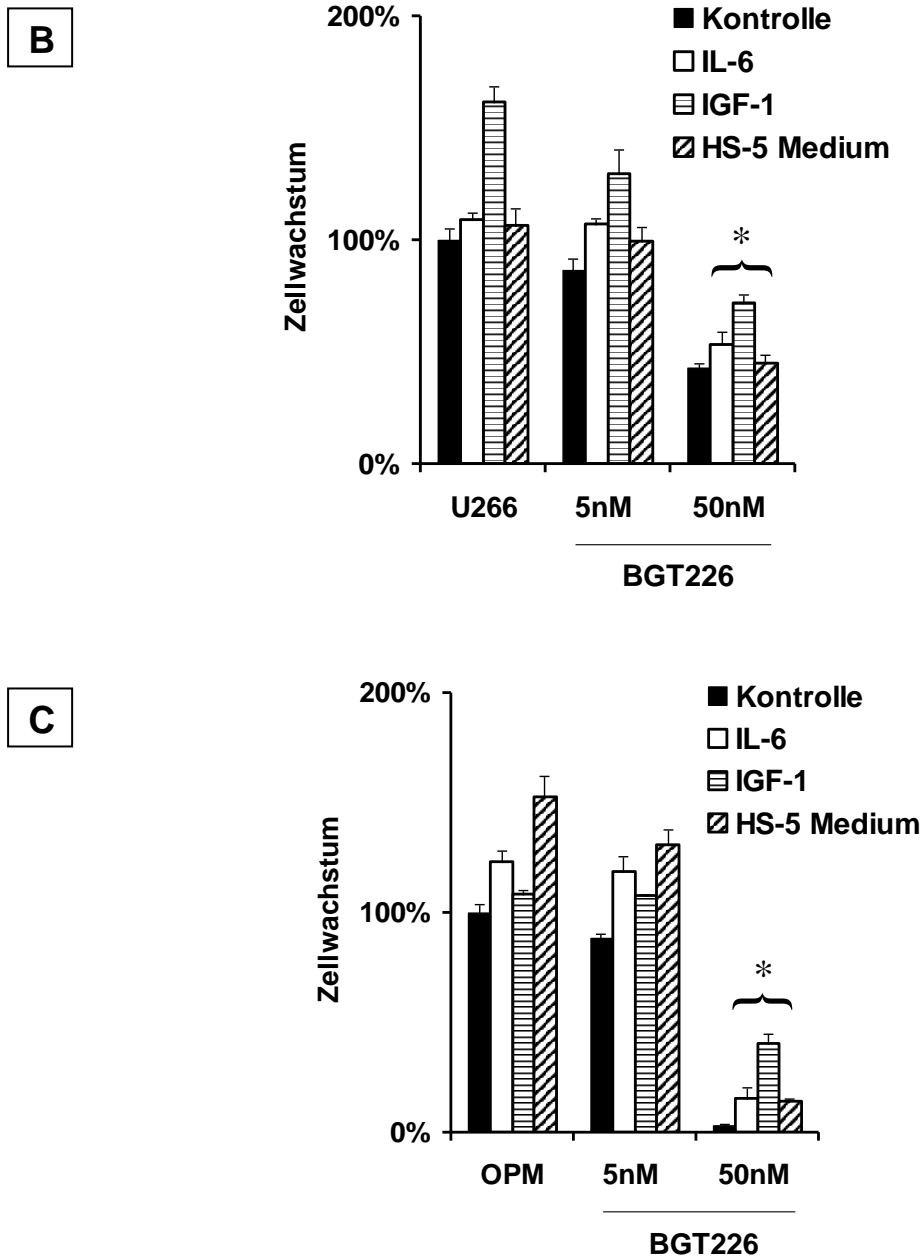
**Abbildung 3.9.: NVP-BGT226 hemmt die Proliferation von Myelomzellen:** Die Zellen der Linien NCI-H929 (NCI), RPMI-8226 (RPMI), U266 und OPM-2 (OPM) wurden über 48h mit Konzentrationen von 20-250nM NVP-BGT226 inkubiert und das Ausmaß der Proliferation mittels BrdU-Assay bestimmt.

Myelomzellen akkumulieren im Knochenmark und haften an Knochenmarkstromazellen. Verschiedenste Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-6 und IGF-1 über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges Wachstum, Proliferation, Zellüberleben und Resistenzen von Myelomzellen beeinflussen. Um zu überprüfen, ob NVP-BGT226 induzierte Hemmung der PI3K den stimulierenden Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgleichen kann, wurden Stimationsversuche durchgeführt.

Zellen der Linien NCI-H929, OPM-2 und U266 wurden mit 5 und 50nM NVP-BGT226 und zusätzlich mit 15ng/ml IL-6 oder 200ng/ml IGF-1 inkubiert. Dabei wurde RPMI1640-Medium ohne FCS verwendet. Außerdem gab es eine Versuchsreihe, in der Myelomzellen mit Medium stimuliert wurden, das 50% HS-5 Stromazellmedium enthielt, welches von einer 48h alten HS5-Stromazellkultur gewonnen wurde.

Es zeigte sich, dass das Zellwachstum aller drei Zelllinien durch die Stimulantien vermehrt war, die Zugabe von NVP-BGT226 diesen Effekt jedoch überwinden konnte (Abb.3.10. A-C). Die Zelllinien unterschieden sich deutlich in ihrem Ansprechen auf die verschiedenen Zytokine, gemeinsam war ihnen jedoch ein stark vermehrtes Zellwachstum aufgrund der Stimulation: IGF-1 führte zu einem Anstieg von 211% bei Zellen der Linie NCI-H929, von 61% bei U266 und 8% bei OPM-2. IL-6 stimulierte das Wachstum von NCI-H929-Zellen um 45%, von U266-Zellen um 8% und von OPM-2-Zellen um 22%. HS-5 Medium erhöhte das Zellwachstum um 154% bei NCI-H929-, um 6% bei U266- um 53% bei OPM-2-Zellen. Dieser deutliche Zuwachs konnte mit nanomolaren Konzentrationen von NVP-BGT226 signifikant gehemmt werden, die stimulatorischen Effekte wurden ausgeglichen.



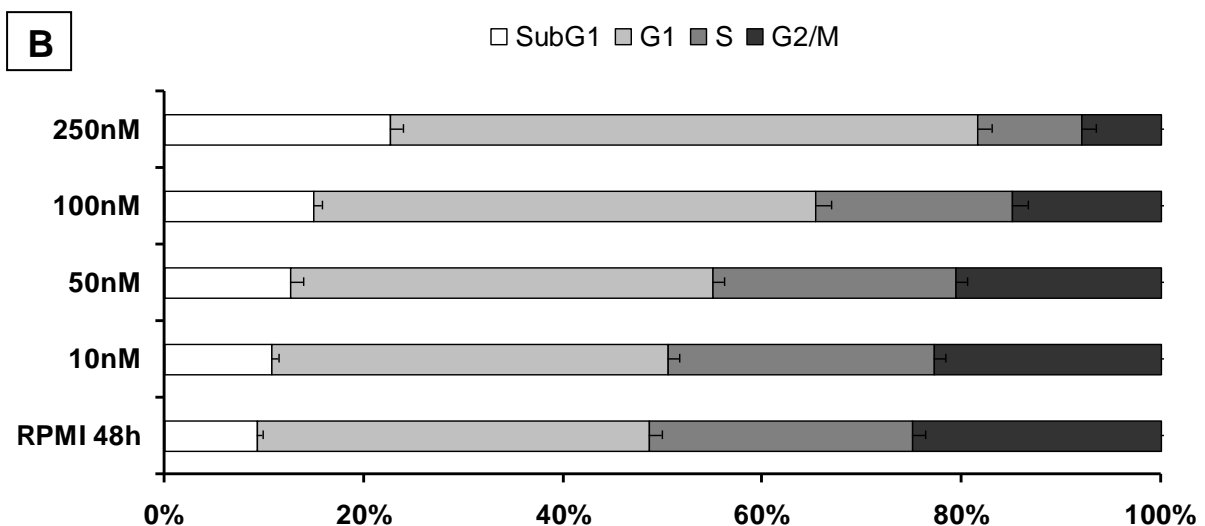
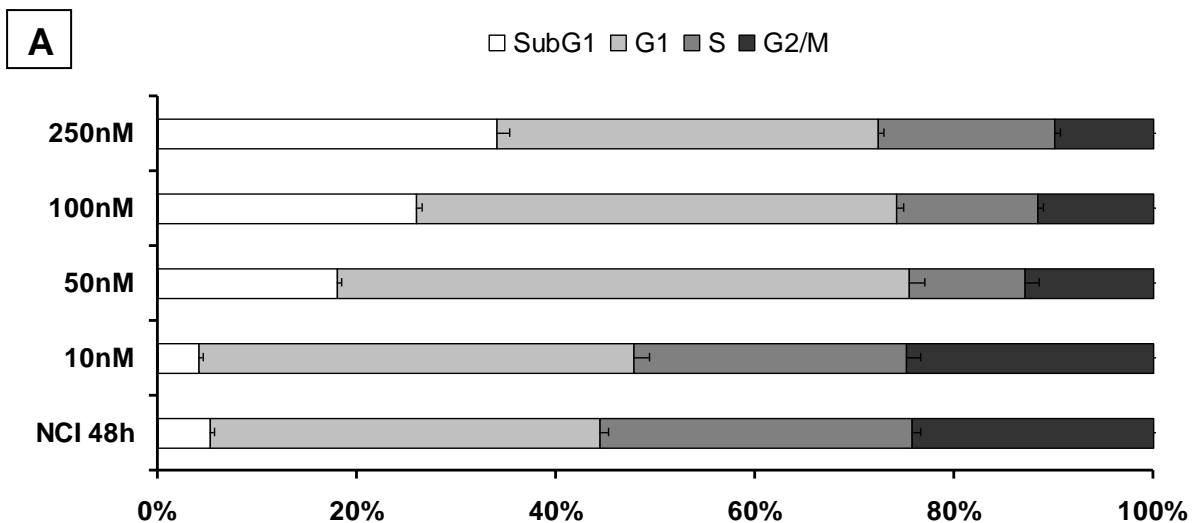


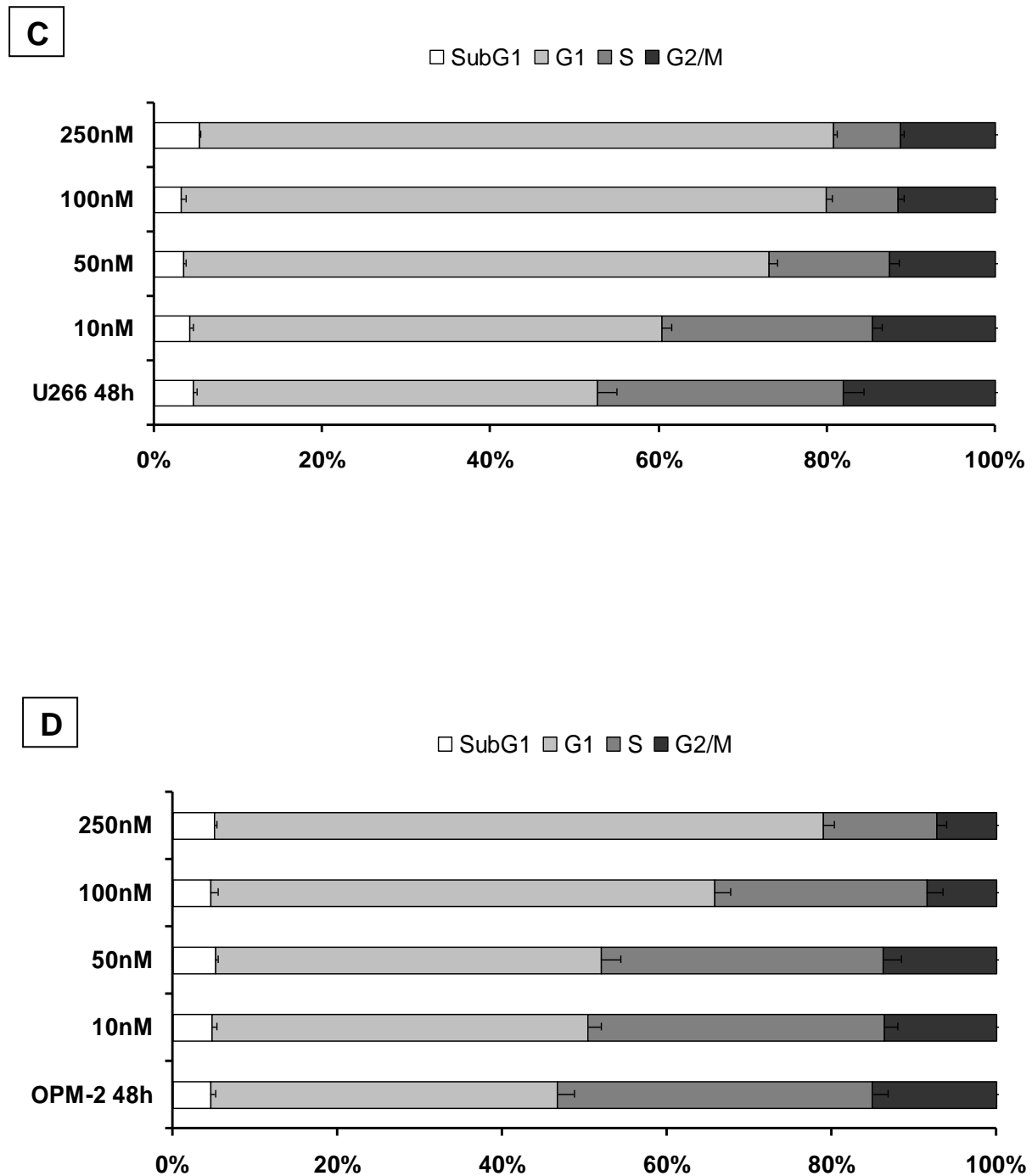
**Abbildung 3.10.: NVP-BGT226 hemmt IL-6-, IGF-1- und HS-5 Medium-induziertes Zellwachstum.** Die Zellen der Linien NCI-H929 (NCI), U266 und OPM-2 (OPM) wurden über 48h mit 5 bzw 50nM NVP-BGT226 und zusätzlich IL-6 (15ng/ml), IGF-1 (200ng/ml) oder HS-5-Medium inkubiert. Anschließend wurde das Zellwachstum mittels WST-1 Assay bestimmt.

### 3.4. NVP-BGT226 bewirkt einen G1 Zellzyklusarrest

Aufgrund der starken Hemmung der Proliferation lag die Vermutung nahe, dass die Hemmung der PI3K einen Zellzyklusarrest bewirkt.

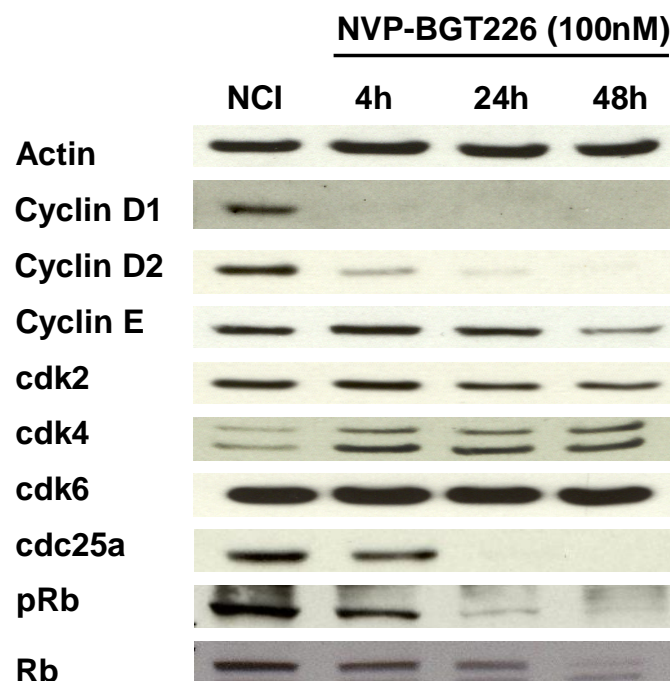
Um dies zu belegen wurden erneut alle vier Zelllinien über 48h inkubiert, diesmal mit Konzentrationen von 10 bis 250nM NVP-BGT226. Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet und für die Zellzyklusuntersuchung durch Durchflusszytometrie vorbereitet. Die folgenden Abbildungen (Abb. 3.11. A-D) zeigen eine Akkumulation von Myelomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus, während die Zahl der Zellen in der S- und G2/M-Phase zurückging. Zudem stieg bei NCI-H929- und RPMI-8226-Zellen ab einer Konzentration von 250nM vor allem die SubG1-Population an, die apoptotische Zellen repräsentiert.





**Abbildung 3.11.: NVP-BGT226 bewirkt einen Zellzyklusarrest:** Die Zellen der Linien NCI-H929 (NCI), RPMI-8226 (RPMI), U266 und OPM-2 wurden über 48h mit Konzentrationen von 10-250nM NVP-BGT226 inkubiert. Nach einer PI-Färbung wurde der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Anhand erneuter Western Blot Experimente konnte genauer bestimmt werden, wie NVP-BGT226 den Zellzyklus beeinflusst. Dafür wurden Zellen der Linie NCI-H929 über 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Dies führte zeitabhängig zu einer abnehmenden Expression von Cyclin D1 und D2, von pRb und cdc25. Die Effekte auf cdk4, cdk2 und Cyclin E waren weniger deutlich, wobei erstere hochreguliert, Cyclin E jedoch hinunterreguliert wurde (Abb.3.12.).



**Abbildung 3.12.: Western Blot: Inkubation von Myelomzellen der Linie NCI-H929 (NCI) mit NVP-BGT226 führt zur verminderten Expression von Cyclin D1, D2, Cyclin E, cdc25a, pRb und Rb.** Die Zellen wurden über 4, 24 und 48h mit 100nM NVP-BGT226 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen.

#### **4. Diskussion**

In der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms spielen sowohl nichtzelluläre als auch zelluläre Komponenten des „Knochenmark-Microenvironments“, darunter verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, eine entscheidende Rolle [37]. Sie bewirken die Aktivierung von Signalwegen, die Zellüberleben, Wachstum und Resistenzen induzieren. Dabei führt die Adhäsion von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen zu deren Stimulation und IL-6 Sekretion [38,39]. IL-6 und viele weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren induzieren ihrerseits eine Aktivierung der PI3K, die Akt und somit auch mTOR aktiviert [40]. Die Aktivierung dieser Signalkaskade scheint mitverantwortlich zu sein für das Überleben und die Proliferation von Myelomzellen. Deshalb sind sowohl PI3K als auch mTOR herausragende Angriffspunkte in der Bekämpfung des Multiplen Myeloms.

In der hier vorliegenden präklinischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges bei der Bekämpfung des Multiplen Myeloms höchst effektiv ist und NVP-BGT226 signifikante Wirkung sowohl auf Zelllinien als auch auf primäre Zellen von Myelompatienten hat.

Die Proteinkinase Akt, die von der PI3-Kinase aktiviert wird, hat durch Einwirkung auf verschiedenste Signalwege multiple Effekte auf Myelomzellen. Wie oben aufgezeigt, hat phosphoryliertes Akt zusätzlich zu seiner antiapoptotischen Wirkung auch stimulierenden Einfluss auf Zellzyklus und Proteinsynthese. Letztere wird über die Aktivierung von mTOR beeinflusst, das somit ebenfalls eine zentrale Rolle im Zellwachstum innehat. So aktiviert mTOR unter anderem 4E-BP-1, das für eine erhöhte Translation von Proteinen zuständig ist [41,42] und P70S6k, welches Apoptose inhibiert und den Zellzyklus vorantreibt [43,44]. Wie schon andere Arbeitsgruppen z.B. an Gliom- oder lymphoblastischen Leukämiezelllinien zeigen konnten [45,46], ergaben auch die hier präsentierten Western Blot Experimente, dass NVP-BGT226 deutlich die Phosphorylierung von Akt, P70S6k und 4E-BP-1 hemmt. Dies stimmt wiederum mit Ergebnissen überein, die auch Versuche mit anderen kombinierten PI3K/mTOR-Inhibitoren erbrachten. Darunter NVP-BEZ235, ein PI3K/mTOR-Inhibitor der ersten Generation und PI 103, ein PI3K/mTOR-Inhibitor, der schon erfolgreich an AML-Zellen erprobt wurde [47] und bei Multiplen Myelomzellen deutlichen Einfluss auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg hat [36,48].



Grundlegend für alle weiteren Versuche war auch die Untersuchung der Stärke des zytotoxischen Effekts von NVP-BGT226 auf Multiple Myelomzellen. Schon in nanomolaren Konzentrationen induzierte es eine deutliche Hemmung des Zellwachstums aller vier verwendeten Zelllinien. Mit Ausnahme der Zellen der Linie OPM-2, die erst bei einer Konzentration von 100nM signifikant im Wachstum gehemmt wurden, reichte bei allen weiteren Zelllinien bereits eine Konzentration von 20nM für eine signifikante Hemmung aus.

Bestätigt wurde die hohe Effektivität von NVP-BGT226 dadurch, dass bei allen Zelllinien bereits bei einer Konzentration von 50nM signifikant Apoptose induziert wurde. Auch primäre Myelomzellen zeigten sich empfindlich auf NVP-BGT226, wobei ebenfalls bei einer Konzentration von 50nM bereits signifikant Apoptose beobachtet werden konnte.

Bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, spielen Caspasen, Enzyme mit proteolytischer Aktivität, eine entscheidende Rolle. Apoptose kann über zwei verschiedene Wege initiiert werden, dem extrinsischen und dem intrinsischen. Bei letzterem kommt es zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, wo unter anderem von der Initiatorcaspase 9 eine Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt wird. An ihrem Ende stehen sogenannte Effektorcaspasen, z.B. Caspase 3, die durch Abbau von Lamin und Actin direkt an der Zerstörung der Zellkernmembran und des Zytoskeletts mitwirken und somit den apoptotischen Tod der Zelle herbeiführen. Die wichtigsten bei der Unterdrückung der Apoptose beteiligten Proteine sind die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2 und Bcl-XL) [49,50].

In den Western Blot Experimenten zeigte sich die verringerte Expression der Caspasen 9 und 3 und ihre Spaltung, was belegt, dass der intrinsische Pfad der Apoptose aktiviert wurde. Dass NVP-BGT226 auch über mitochondriale Proteine Einfluss auf Apoptosemechanismen ausübt, zeigt die erhöhte Expression proapoptotischer Proteine wie Bim und Bak und eine Verminderung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-XL, Bcl-2 und Noxa. Die Expression der Caspase 8, die am extrinsischen Weg der Apoptose beteiligt ist, blieb unverändert.

Insgesamt stimmen diese Versuche zu Hemmung von Zellwachstum und Apoptoseinduktion mit früheren Ergebnissen der PI3K/mTor-Inhibitoren NVP-BEZ235 und PI103 überein. Im Gegensatz zu NVP-BEZ235 zeigen sich bei NVP-BGT226 jedoch deutlich niedrigere  $IC_{50}$ -Werte für Zellviabilität und Apoptose, was seine

höhere Potenz unterstreicht. Vergleichbar sind auch die Ergebnisse der Western Blot Experimente zur Apoptoseinduktion: Auch bei NVP-BEZ235 zeigten sich eine ausgeprägte Spaltung der Caspasen 3 und 9, eine Zunahme der pro- und eine Abnahme antiapoptotischer mitochondrialer Proteine [48]. Auch PI 103 hemmt bei Multiplen Myelomzellen signifikant das Zellwachstum und induziert Apoptose. Im direkten Vergleich mit reinen PI3K- oder mTOR-Inhibitoren konnten von Stengel et al. deutliche Vorteile zugunsten der dualen Hemmung herausgestellt werden [36].

Die Hypothese, dass die Hemmung von PI3K und mTOR durch NVP-BGT226 die Zellproliferation inhibiert, konnte mittels BrdU-Assays bestätigt werden.

Die Proliferation von Zellen der Linien NCI-H929, U266 und RPMI-8226 wurde bereits ab einer Konzentration von 20nM signifikant gehemmt, die von OPM-2 Zellen bei 50nM. Dies stimmt in etwa überein mit den Ergebnissen, die die Vorgänger-Substanz NVP-BEZ235 erbringen konnte und mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen [40,48].

Zytokine und Wachstumsfaktoren stimulieren maligne Plasmazellen sehr effektiv, was zur Aktivierung verschiedenster Signalwege, wie dem PI3K/Akt-, dem JAK/STAT- und dem MEK/ERK-Signalweg führt [51,52].

Besonders IL-6 und IGF-1 kommen dabei eine wichtige Rolle zu: IL-6, das in Knochenmarkstromazellen und von Multiplen Myelomzellen selbst gebildet werden kann, ist ein essentieller antiapoptotischer Faktor und vermittelt über verschiedene Signalwege Wachstum, Überleben und Arzneimittelresistenz von Tumorzellen [53,54].

IGF-1 stimuliert als Wachstumsfaktor die Mitose vieler Zellarten und gilt beim Multiplen Myelom als Induktor von Proliferation und Antiapoptose [55].

In den vorliegenden Versuchen konnte NVP-BGT226 selbst die starke proliferative Stimulation durch IL-6, IGF-1 und HS-5 Medium überwinden: Das Zellwachstum von Zellen der Linien NCI-H929 und U266 wurde am effektivsten durch IGF-1, das von OPM-2-Zellen durch konditioniertes Medium gesteigert. Gemeinsam war den drei Zelllinien, dass diese Stimulation bei einer Konzentration von 50nM NVP-BGT226 überwunden wurde und signifikant niedrigeres Zellwachstum beobachtet werden konnte. Vergleichbare Effekte wurden mit NVP-BEZ235 erst bei einer höheren Konzentration von 100nM erreicht [48].

Die Analyse des Zellzyklus zeigte, dass die verringerte Proliferation auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist: Bei allen vier Zelllinien konnte mit zunehmenden Konzentrationen von NVP-BGT226 ein deutlicher Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus festgestellt werden, wobei besonders bei Zellen der NCI-H929- und RPMI-8226-Linien ab einer Konzentration von 250nM vor allem die SubG1-Population anstieg, die apoptotische Zellen repräsentiert. Dies stimmt überein mit den vorliegenden Ergebnissen der Apotosemessung per Annexin/PI-Färbung (s.o.).

Auch auf anderen Gebieten der Onkologie wurde bereits die wichtige Rolle der PI3K bei Proliferation und Zellzyklus herausgestellt [56].

Entscheidend für die Steuerung der Zellzyklusphasen sind die Cycline, Proteine, die phasenspezifisch exprimiert werden. Zusammen mit Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk's) bilden sie Heterodimere und können an wichtigen Kontrollpunkten des Zyklus, den Restriktionspunkten, den nächsten Schritt im Zellzyklus einleiten. So bestimmen Cyclin D und E zusammen mit cdk 4 und 6 am Ende der G1-Phase, ob die Zelle in die S-Phase eingeht. Auch das Retinoblastoma-Protein Rb nimmt eine zentrale Rolle ein. Wird es von einem Cyclin/cdk-Dimer aktiviert führt dies zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren und zur Transkription verschiedener für die S-Phase notwendiger Gene. Die Phosphatase cdc25 steuert zusammen mit anderen Faktoren den Übergang von G2- zu Mitosephase [57].

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Expression der Cycline D1, D2 oder D3 bei allen Myelompatienten dysreguliert und im Gegensatz zu gesunden Zellen vermehrt ist [58].

Auch bei der Auswertung der hier vorliegenden Western Blot Experimente wurde deutlich, dass die Expression der für den Zellzyklus von Myelomzellen essentiellen Proteine dysreguliert ist. Diese Versuche konnten zeigen, dass der G1-Zellzyklusarrest seinen Ursprung in einer verminderten Expression von Cyclin D1, Cyclin D2, pRb und cdc25 hat. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen sind auch die Resultate, die eine PI3K/mTOR-Hemmung mit NVP-BEZ235 bzw. PI 103 erbrachten: Bei beiden Substanzen zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Zellzyklusarrest in der G1-Phase und eine verminderte Expression von Cyclinen und pRb [48,59].

Die Ergebnisse dieser präklinischen Studie zur Wirkung von NVP-BGT226 auf Multiple Myelomzellen zeigen, dass durch die duale Hemmung von PI3-Kinase und

mTOR die essentiellen Vorgänge von Zellwachstum, Proliferation, Fortführung des Zellzyklus und Antiapoptose in den Zellen von vier verschiedenen Myelom-Zelllinien sowie in primären Myelomzellen signifikant gehemmt werden können. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der anderen dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren wird die außerordentliche Wirksamkeit dieser Substanzgruppe bestätigt und im Vergleich zeigt sich NVP-BGT226 schon in äußerst niedrigen Konzentrationen als besonders effektiv. Es erweist sich als sehr vielversprechend, den kombinierten PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BGT226 in weiteren präklinischen und klinischen Studien auf seine Anwendbarkeit in der Therapie des Multiplen Myeloms zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Beim Multiplen Myelom infiltrieren maligne entartete Plasmazellen das Knochenmark, verdrängen dort die Hämatopoese und führen zu Osteolysen. Die Patienten leiden unter pathologischen Frakturen und Knochenschmerzen, Anämie, Infektanfälligkeit, Hyperkalzämie und Nierenfunktionsstörungen und versterben auch nach erfolgter Remission meist an Rezidiven der Erkrankung.

In den letzten Jahren ergaben sich durch wachsende Erkenntnisse in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms verschiedenste neue Therapieansätze. Vor allem das Verständnis zentraler Signaltransduktionswege, die für Wachstum, Proliferation und Apoptose zuständig sind, führte zu neuen möglichen Ansatzpunkten. In der vorliegenden Studie wurde ein kombinierter PI3K/mTOR-Inhibitor hinsichtlich seiner Wirkung auf Myelomzelllinien und primäre Myelomzellen untersucht. Western Blot Experimente konnten belegen, dass zentrale Komponenten des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges durch NVP-BGT226 in ihrer Expression gehemmt werden, darunter Akt, P70S6k und 4E-BP-1.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NVP-BGT226 bereits in nanomolaren Konzentrationen das Wachstum von Multiplen Myelomzellen zeit- und konzentrationsabhängig hemmt. Durch Annexin-V/PI-Färbung wurde nachgewiesen, dass NVP-BGT226 sowohl in Zellen verschiedener Zelllinien als auch in primären Myelomzellen von Patienten Apoptose auslöst und diese über den intrinsischen Weg eingeleitet wird. An diesem sind unter anderem Caspase 9, Caspase 3 und mitochondriale Proteine der Bcl-2 Familie beteiligt. Die Auswertung des BrdU-Assays ergab außerdem eine starke Hemmung der Proliferation. In den Stimulationsversuchen wurden die Zellen am effektivsten durch IGF-1 zur Proliferation angeregt. Dieser Effekt konnte jedoch durch eine Zugabe von NVP-BGT226 durchbrochen werden und es kam zu signifikant niedrigerem Zellwachstum. Die Hemmung der Proliferation wurde durch die Zellzyklusanalyse genauer differenziert: die Versuche ergaben einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der bei allen vier verwendeten Zelllinien sehr deutlich ausfiel. Bei Western Blot Experimenten zeigte sich, dass diese Hemmung des Zellzyklus mit einer verminderten Expression von Cyclin D1, Cyclin D2, cdc25a und pRb verbunden ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NVP-BGT226 als erster Repräsentant der zweiten Generation von dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren ein starker Inhibitor des

Zellwachstums, der Proliferation und des Zellzyklus von Myelomzellen ist und signifikant Apoptose induziert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es vielversprechend ist, die Untersuchungen an dieser Substanz in präklinischen und klinischen Studien weiter zu verfolgen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Rajkumar S.V.: Pathobiology of multiple myeloma. Uptodate version 20.3. (www.uptodate.com) 2012.
- 2 Rajkumar S.V.: Clinical features, laboratory manifestations and diagnosis of multiple myeloma. Uptodate version 20.3. (www.uptodate.com) 2012.
- 3 Kyle R.A., Rajkumar S.V., Multiple Myeloma. N Engl J Med, 2004;351:1960-1973.
- 4 Hallek M., Bergsagel P.L., Anderson K.C., Multiple Myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. Blood, 1998;91:3-21.
- 5 Kyle R.A., Gertz M.A., Witzig T.E., Lust J.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A., et al., Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc, 2003;78(1):21-33.
- 6 Attal M., Harousseau J.L., Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am, 1997;11:133-146.
- 7 Attal M., Harousseau J.L., Facon T., Guilhot F., Doyen C., Fuzibet J.G., et al., Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med, 2003;349:2495-2502.
- 8 Martinez-Lopez J., Blade J., Mateos M.V., Grande C., Alegre A., et al., Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. Blood, 2011;118(3):529-534.
- 9 Barlogie B., Tricot G.J., van Rhee F., Angtuaco E., Walker R., Epstein J., et al., Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. Br J Haematol, 2006;135(2):158-164.
- 10 Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. Blood, 2008;111(5):2516-2520.

- 11 APEX (Assessment of Proteasome inhibition for Extending remissions) trial: phase III randomized, multicenter, placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of bortezomib versus dexamethasone in patients with recurrent or treatment-resistant multiple myeloma. Clin Adv Hematol Oncol, 2003;1:190.
- 12 Gregory W.M., Richards M.A., Malpas J.S., Combination chemotherapy versus melphalan and prednisolone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. J Clin Oncol, 1992;10:334-342.
- 13 Singhal S., Mehta J., Desikan R., Ayers D., Roberson P., Eddlemon P., et al., Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. N Engl J Med, 1999;341:1565-1571.
- 14 Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., et al., Clinical factors predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma. Blood, 2005;106:2977-2981.
- 15 Tricot G., New insights into the role of microenvironment in multiple myeloma. Lancet, 2000;355:248-250.
- 16 Schmidmaier R., Baumann P., Anti-Adhaesion evolves to a promising therapeutic concept in oncology. Curr Med Chem, 2008;15(10):978-90.
- 17 Jelinek D.F., Witzig T.E., Arendt B.K., A role for insulin-like growth factor in the regulation of IL-6-responsive human myeloma cell line growth. J Immunol, 1997;159:487-496.
- 18 Klein B., Tarte K., Jourdan M., Mathouk K., Moreaux J., Jourdan E., et al., Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. Int J Hematol, 2003;78:106-113.



- 19 Ferlin M., Noraz N., Hertogh C., Brochier J., Taylor N., Klein B., Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol*, 2000;111:626-634.
  
- 20 Freund G.G., Kulas D.T., Mooney R.A., Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPMI 8226. *J Immunol*, 1993;151:1811-1820.
  
- 21 Ge N.L., Rudikoff S., Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth in vivo. *Oncogene*, 2000;19:4091-4095.
  
- 22 Baumann P., Mandl-Weber S., Emmerich B., Straka C., Schmidmaier R., Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Exp Cell Res*, 2007;313:3592-3603.
  
- 23 Schmidmaier R., Baumann P., Bumeder I., Meinhardt G., Straka C., Emmerich B., First clinical experience with simvastatin to overcome drug resistance in refractory multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 2007;79:240-243.
  
- 24 Demchenko Y.N., Kuehl W.M., A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*, 2010;1:59-68.
  
- 25 Monaghan K.A., Khong T., Burns C.J., Spencer A., The novel JAK inhibitor CYT387 suppresses multiple signalling pathways, prevents proliferation and induces apoptosis in phenotypically diverse myeloma cells. *Leukemia*, 2011; 25:1891-9.
  
- 26 Ramakrishnan V., Kimlinger T., Haug J., Timm M., Wellik L., Halling T. et al., TG101209, a novel JAK2 inhibitor, has significant in vitro activity in multiple myeloma and displays preferential cytotoxicity for CD45+ myeloma cells. *Am J Hematol*, 2010;85:675-86.

- 27 Glienke W., Maute L., Wicht J., Bergmann L., The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BGT226 induces cell cycle arrest and regulates survivin gene expression in human pancreatic cancer cell lines. *Tumour Biol.*, 2011; Dec 15
  
- 28 Chang K.Y., Tsai S.Y., Wu C.M., Yen C.J., Chuang B.F., Chang J.K., Novel PI3K/mTOR dual inhibitor, NVP-BGT226, displays potent growth-inhibitory activity against human head and neck cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.*, 2011;17(22):7116-26.
  
- 29 Sanchez C.G., Ma C.X., Crowder R.J., Guintoli T., Phommaly C., Gao F., et al., Preclinical modeling of combined PI3K inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast cancer Res.*, 2011;13(2):R21
  
- 30 Younes H., Leleu X., Hatjiharissi E., Moreau A.S., Hideshima T., Richardson P., et al., Targeting the PI3-Kinase Pathway in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2007;10(13)July1:3771-3775.
  
- 31 Wymann M.P., Pirola L., Structure and function of PI3-Kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1998;1436:127-50.
  
- 32 Serra V., Markman B., Scaltriti M., Eichhorn P.J., Valero V., Guzman M., et al., NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 2008;68:8022-8030.
  
- 33 Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., Guan K.L., TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 2002;4:648-657.
  
- 34 Shi Y., Yan H., Frost P., Gera J., Lichtenstein A., Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*, 2005;4:1533-1540.

- 35 O'reilly K.E., Rojo F., She Q.B., Solit D., Mills G.B., Smith D., et al., mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 2006;66:1500-1508.
  
- 36 Stengel C., Cheung C.W., Quinn J., Yong K., Khwaja A., Optimal induction of myeloma cell death requires dual blockade of phosphoinositide 3-kinase and mTOR signalling and is determined by translocation subtype. *Leukemia*, 2012;26:1761-1770.
  
- 37 Podar K., Chauhan D., Anderson K.C., Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia*, 2009;23:10-24.
  
- 38 Huston A., Leleu X., Jia X., Moreau A.S., Ngo H.T., Runnels J., et al., Targeting Akt and heat shock protein 90 produces synergistic multiple myeloma cell cytotoxicity in the bone marrow microenvironment. *Clin Cancer Res*, 2008;14:865-874.
  
- 39 Shain K.H., Yarde D.N., Meads M.B., Huang M., Jove R., Hazlehurst L.A., et al., Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res*, 2009;69:1009-1015.
  
- 40 Mcmillin D.W., Ooi M., Delmore J., Negri J., Hayden P., Mitsiades N., et al., Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res*, 2009;69:5835-5842.
  
- 41 Xu R.H., Pelicano H., Zhang H., Giles F.J., Keating M.J., Huang P., Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia*, 2005;19:2153-2158.

- 42 Ikezoe T., Nishioka C., Bandobashi K., Yang Y., Kuwayama Y., Adachi Y., et al., Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res*, 2007;31:673-682.
- 43 Lane H.A., Fernandez A., Lamb N.J., Thomas G., p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature*, 1993;363:170-172.
- 44 Harada H., Andersen J.S., Mann M., Terada N., Korsmeyer S.J., p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;98:9666-9670.
- 45 Liu T.J., Koul D., Lafortune T., Tiao N., Shen R.J., Maira S.M., et al., NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Mol Cancer Ther*, 2009;8:2204-2210.
- 46 Chiarini F., Grimaldi C., Ricci F., Tazzari P.L., Evangelisti C., Ognibene A., et al., Activity of the Novel Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235 against T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research*, 2010;70:8097-8107.
- 47 Park S., Chapuis N., Bardet V., Tamburini J., Gallay N., Willems L., et al., PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia*. 2008 Sep;22(9):1698-706.
- 48 Baumann P., Mandl-Weber S., Oduncu F., Schmidmaier R., The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp Cell Res*, 2009;315:485-497.
- 49 Hengartner M.O., The Biochemistry of Apoptosis, *Nature*, 2000;407:770-776.

- 50 Wetzker R., Induzierte Apoptose als Therapiekonzept in der Onkologie. *Onkologe*, 2000;6:438–442.
- 51 Hideshima T., Richardson P., Anderson K.C., Novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Immunol Rev*, 2003;194:164-176.
- 52 Yasui H., Hideshima T., Richardson P.G., Anderson K.C., Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2006 Feb;132(4):385-97.
- 53 Klein B., Zhang X.G., Jourdan M., et al., Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989;732:517-526.
- 54 Hideshima T., Nakamura N., Chauhan D., Anderson K.C., Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001;20(42):5991-6000.
- 55 Baumann B., Hagemeyer H., Mandl-Weber S., Franke D., Schmidmaier R., Myeloma cell growth inhibition is augmented by synchronous inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor by NVP-AEW541 and inhibition of mammalian target of rapamycin by Rad001. *Anti-Cancer Drugs*, 2009;20(4): 259-66.
- 56 Wierod L., Rosseland C.M., Lindeman B., Oksvold M.P., Grosvik H., Skarpen E., et al., CDK2 regulation through PI3K and CDK4 is necessary for cell cycle progression of primary rat hepatocytes. *Cell Prolif*, 2007;40:475-487.
- 57 Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R., *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Auflage 2006, S. 514ff
- 58 Hideshima T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Anderson K.C., Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 2004;104:607-618.

- 59 Glassford J., Kassen D., Quinn J., Stengel C., Kallinikou K., Khwaja A., Yong K.L., Inhibition of cell cycle by dual Phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR blockade in cyclin D2 positive multiple myeloma bearing IgH translocations. Blood Cancer J, 2012 Jan;2(1):e50.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP-1	4E-binding protein-1
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrdU	Bromodeoxyuridin
cdc	cell division cycle
cdk	cyclin-dependent kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL-Lösung	enhanced chemiluminescence-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA-Reader	enzyme linked immunosorbent assay-Reader
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-Phase	G für engl. "gap"
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
Mot1/min	Drehzahl des Motors beim Schüttler
M-Phase	Mitosephase
M-TBS-T	Magermilchpulver - TRIS buffered saline - Tween20
mTOR	mammalian target of rapamycin

n.s.	nicht signifikant
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sodium Orthovanadat
NaF	Natriumfluorid/ Sodiumfluorid
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NP-40	Nonidet P-40
P70S6K	p70-ribosomal S6 kinase
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	retinoblastoma protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Revolutions per minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institute “-1640)
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S-Phase	Synthesephase
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBS	TRIS buffered saline
TBS-T	TRIS buffered saline-Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST-1	water soluble tetrazolium-1



## **8. Abbildungsverzeichnis**

### **Einleitung:**

Abb. 1.: PI3K/Akt-Signalweg

Modifiziert nach Younes H. et al., Targeting the PI3-Kinase Pathway in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res 2007;10(13)July1:3771-3775.

### **Material und Methoden:**

Abb. 2.1.: WST-Assay

Quelle: CytoScan

Abb. 2.2.: AnnexiV/PI-Apoptose-Assay

Quelle: CLS Flow Cytometry

Abb. 2.3.: SubG1 Zellzyklusanalyse

Abb. 2.4.: BrdU-Assay

Abb. 2.5.: Proteinnachweis beim Western Blot

### **Ergebnisse:**

Abb. 3.1. und Abb. 3.2.: NVP-BGT226 hemmt den PI3K/Akt-Signalweg

Abb. 3.3.: NVP-BGT226 hemmt das Zellwachstum

Abb. 3.4.: Apoptoseinduktion: AnnexinV/PI-Färbung

Abb. 3.5.: NVP-BGT226 induziert Apoptose bei Myelomzelllinien

Abb. 3.6.: NVP-BGT226 induziert Apoptose bei primären Myelomzellen

Abb. 3.7.: NVP-BGT226 führt zur Spaltung von Caspasen

Abb. 3.8.: NVP-BGT226 führt zur gesteigerten Expression von proapoptotischen und zur verminderten Expression von antiapoptotischen Proteinen

Abb. 3.9.: NVP-BGT226 hemmt die Proliferation

Abb. 3.10.: NVP-BGT226 hemmt IL-6-, IGF-1- und HS-5 Medium –induziertes Zellwachstum

Abb. 3.11.: NVP-BGT226 bewirkt einen Zellzyklusarrest

Abb. 3.12.: NVP-BGT226 hemmt die Expression von Cyclinen

## 9. Anhang

### 9.1. Materialien und Geräte

#### 9.1.1 Zellkultur

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
NCI-H929	ACC 163	DSMZ, Braunschweig, D
RPMI-8226	ACC 402	DSMZ, Braunschweig, D
U266	ACC 9	DSMZ, Braunschweig, D
OPM-2	ACC 50	DSMZ, Braunschweig, D

RPMI-1640	BE12 -702F	Lonza, Basel, CH
PBS	20012-068	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
FCS	16170-078	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
Flask 25 cm <sup>2</sup>	353.014	BD Falcon, Heidelberg, D
Flask 75 cm <sup>2</sup>	353.136	BD Falcon, Heidelberg, D
Flask 175 cm <sup>2</sup>	353.118	BD Falcon, Heidelberg, D

Pipette 5ml	86.1253.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipette 10ml	86.1254.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipette 25ml	86.1685.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipetus-Akku	-	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Cell Scraper 25cm	353.086	BD Falcon, Heidelberg, D
Cell Scraper 40cm	353.087	BD Falcon, Heidelberg, D

Trypanblaulösung	15250-061	15250-061 Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
Neubauer Zählkammer	-	Sarstaedt, Nümbrecht, D

Röhrchen 15ml	62.554.502	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen 50ml	62.547.254	Sarstedt, Nümbrecht, D
6-well-plates	353.453	BD Falcon, Heidelberg, D
24-well-plates	353.047	BD Falcon, Heidelberg, D
96-well-plates	CLS 3596	Corning Costar, Corning, USA

### 9.1.2 Inhibitor

NVP-BGT226		Novartis, Basel, CH
------------	--	---------------------

### 9.1.3 Zytokine

IL-6	206-IL	R&D Systems, Wiesbaden, D
IGF-1	291-G1	R&D Systems, Wiesbaden, D

### 9.1.4. Chemikalien

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
ECL	RPN2106	Amersham, Little Chalfont, UK
AnnexinV-FITC	AnnexinV01-3	Invitrogen, Karlsruhe, D
WST-1	11644807001	Roche, Penzberg, D
Marker: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	161-0375EDU	Bio-Rad, München, D
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	500-0006	Bio-Rad, München, D
Propidiumiodid	537059	Calbiochem/ Merck, Darmstadt,
Ficoll Paque	17-1440-03	Amersham, Little Chalfont, UK
PMSF	93482	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Leupeptin	L2884	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	351-027-100	Quality Biological , Inc. Gaithersburg, USA
Aprotinin	A6279	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tween 20	P7949	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Acrylamid/Bis (30% (37.5:1))	161-0158	Bio-Rad, München, D
APS	161-0700	Bio-Rad, München, D
TEMED	161-0800	Bio-Rad, München, D
NP-40	74385	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
BrdU-Kit	11647229001	Roche, Penzberg, D

### 9.1.5. Material für Western Blot

#### 9.1.5.1 Antikörper

Primäre Antikörper	Bestellnummer	Hersteller
Actin	sc-1616	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Caspase3	sc-1226	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
CLC3	9661	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Caspase9	9502	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
CLC9	9501	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Caspase8	9746	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
CLC8	9748	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Bad	sc-943	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pBad	9295	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Mcl-1	sc-819	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bcl-Xl	sc-1041	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bcl-2	sc-578	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bim-EL	sc-11425	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bax	sc-493	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D

Noxa	sc-26917	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bak	sc-1035	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin D1	sc-753	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin D2	sc-754	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin E	sc-481	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
cdk2	sc-163	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
cdk4	sc-749	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
cdk6	sc-177	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
cdc25a	sc-7389	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pRb	9308	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Rb	sc-50	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pAkt Ser473	sc-7985	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pAkt Thr308	sc-16646	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Akt	sc-8312	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pmTor	2971	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
mTor	2972	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
pP70S6k	9204	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
P70S6k	9202	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
p4EBP-1	9455	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
4EBP-1	9452	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
pStat3	9131	CellSignaling, Frankfurt/Main, D

Stat3	sc-7179	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
-------	---------	---

<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Schwein Anti-Kaninchen/ HRP	P0217	Dako , Carpinteria, USA
Kaninchen Anti-Ziege Ig/ HRP	P0449	Dako , Carpinteria, USA

#### 9.1.5.2 sonstiges Material

<b>Artikel</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Mini-PROTEAN-Comb, 10 wells, 1mm	165-3359	Bio-Rad, München, D
Spacer Plates	165-3311	Bio-Rad, München, D
Schwämme, 8 x11cm	170-3933	Bio-Rad, München, D
SDS-PAGE Standards, broad range	161-0318	Bio-Rad, München, D
Immobilon-P PVDF Membran	IPVH00010	Millipore, Schwalbach, D
Kodak Biomax XAR- 5.165.1454 Film	F5513	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NaCl	S7581	Mallinckrodt, Hazelwood, USA
NaF	S1504	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	S6508	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris, 1M, pH 7,5	351-006-100	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA
Tris, 1,5M, pH 8,8	A611-J831-10	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA

#### 9.1.6 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometer	Epics CL System II, Version 3.0	BeckmanCoulter, Miami, USA
Elektrophoreseset	Ready Gel Cell	Bio-Rad, München, D
Power Pac	164-5050	Bio-Rad, München, D

---

BioFuge	75005181	Heraeus instruments, Osterode, D
Biophotometer	-	Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank	Serie II 3110	Forma Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Sigma-Aldrich 4K1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Zentrifuge	Rotina 46R	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
ELISA Reader	Mithras	Berthold, Bad Wildbad, D

## **Eidesstattliche Versicherung**

Schneider, Laura Anna Iolanda

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In vitro Untersuchungen beim Multiplen Myelom:  
NVP-BGT226, ein kombinierter Inhibitor von Phosphatidylinositol-3-Kinase und  
mammalian Target of Rapamycin, hemmt Wachstum, Proliferation und  
Zellzyklusprogression und induziert Apoptose

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient  
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen  
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der  
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder  
in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen  
Grades eingereicht wurde.